Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Magíster en Biotecnología y Ciencias de la Vida

# Rol de enzimas modificadoras de histonas *KDM6B* y *KMT2C* en el desarrollo del Trastorno del Espectro Autista

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Biotecnología y Ciencias de la Vida

**Bastián Andrés Brauer Castillo**

Director de Tesis: Dr. Fernando J Bustos

Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAB, Santiago, Chile.

Enero 2023

**Agradecimientos**

Primero agradecer a mi tutor, Dr. Fernando J Bustos por la oportunidad de poder realizar la tesis de pregrado y magíster en su laboratorio, por su disposición, consejos, buena onda y siempre empujarme a hacer un poco más, sin duda fue una experiencia enriquecedora.

Agradezco también los consejos de parte de la Dra. Gloria Arriagada que me sirvieron para desarrollar los experimentos de esta tesis de magíster, y también por su disposición para ayudar a corregir el escrito. Gracias a mis compañeros de laboratorio Nico, Conni, Leandro, Camila, Claudio y Rodrigo, por su apoyo en estos años. También agradecer a Giovanna, por su ayuda y compañía durante este periodo.

Por último, agradecer de corazón a mis papás Carlos y Julia, que saben que el camino hasta esta instancia no ha sido para nada fácil. Espero poder retribuir todo lo que han hecho por mí. A mi abuela Carmen por siempre apoyarme y preguntar como me había ido en el laboratorio, y también a mi hermano Felipe por los buenos momentos que hemos compartido y que me sirvieron para despejar un poco la mente. Los quiero mucho a todos.

Esta tesis de magíster fue financiada por: FONDECYT Iniciación 11180540 (F.J.B.), PAI 77180077 (F.J.B.), FONDECYT 1220480 (G.A.) y DI-03-21/APP (B.B.C.) (UNAB).

**Índice de contenido**

**Índice de Figuras y Tablas** 4

**Listado de Abreviaturas** 5

**I. Resumen** 6

**II. Introducción** 8

Trastorno del Espectro Autista y su origen genético 8

Organización del material genético en células eucariontes y epigenética 9

Modificaciones covalentes de las colas de histonas 10

TEA asociado a disfunción de enzimas que regulan la expresión génica 13

Maduración neuronal y TEA 15

Tecnologías actuales como herramientas en biomedicina 16

**III. Hipótesis y Objetivos** 17

**IV. Materiales y Métodos** 19

Diseño experimental 19

Producción de AAV 19

Animales experimentales y administración de partículas virales AAV 20

Pruebas de comportamiento 21

1. Rotarod 21
2. Campo abierto 22
3. Cambios de luz/oscuridad 22
4. Enterramiento de canicas 22
5. Laberinto cero elevado 23
6. Tres cámaras 23
7. Interacciones sociales 24
8. Dominancia del tubo 24
9. Condicionamiento al miedo 25
10. Laberinto de Barnes 25

Preparación de corteza e hipocampo 26

Extracción de ARN y RT-qPCR 27

Extracción de proteínas nucleares 29

Western blot 29

Inmunofluorescencia de tejido 30

Ensayo Surveyor 30

Análisis de datos 31

**V. Resultados** 31

**Objetivo Específico 1. Analizar el rol de la enzima *KDM6B* en el desarrollo de un fenotipo de TEA en ratones KO.** 34
1.1 Analizar cambios de expresión y cambios en las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas asociadas a la pérdida de función de *KDM6B*. 34
1.2 Determinar la aparición de comportamientos tipo TEA en animales *KDM6B* KO. 43
1.2.1 Análisis de ansiedad y comportamientos repetitivos en animales *KDM6B* KO. 45
1.2.2 Comportamientos asociados a la capacidad social de la condición *KDM6B* KO. 51
1.2.3 Evaluación de memoria en animales *KDM6B* KO. 56
**Objetivo específico 2. Analizar el rol de la enzima *KMT2C* en el desarrollo de un fenotipo de TEA en ratones KO.** 60
2.1 Analizar cambios de expresión y cambios en las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas asociadas a la pérdida de función de *KMT2C*. 60
2.2. Determinar la aparición de comportamientos tipo TEA en animales *KMT2C* KO. 69
2.2.1 Análisis de ansiedad y comportamientos repetitivos en animales *KMT2C* KO. 71
2.2.2 Comportamientos asociados a la capacidad social de la condición *KMT2C* KO. 77
2.2.3 Evaluación de memoria en animales *KMT2C* KO. 82
**VI. Discusión** 85
1.1 Análisis de expresión de la condición *KDM6B* KO y la marca H3K27me3. 86
1.2 Asociación de la pérdida de función de *KDM6B* con comportamientos tipo TEA. 88
2.1 Análisis de expresión de la condición *KMT2C* KO y las marcas postraduccionales H3K4me1 y H34Kme3. 90
2.2 Asociación de la pérdida de función de *KMT2C* con comportamientos tipo TEA. 92
3. Hallazgos asociados a los animales *KDM6B* y *KMT2C* KO. 94
**VII. Conclusiones** 97
**VIII. Referencias** 98

**Índice de Figuras y Tablas**

**Figuras**


**Figura 1.** Función de *KDM6B* y *KMT2C* sobre las modificaciones covalentes en las colas de histonas y efecto esperado luego del KO. **13**

**Figura 2.** Secuencias de ARNg y su ubicación en genoma de *Mus musculus.* **33**

**Figura 3.** Expresión relativa de *KDM6B* en corteza de animales. **37**

**Figura 4.** Inmunofluorescencia representativa de condición control y *KDM6B* KO contra *KDM6B*. **38**

**Figura 5.** Western blot representativo de *KDM6B* KO. **39**

**Figura 6.** Edición del genoma en animales *KDM6B* KO. **41**

**Figura 7.** Cambios de expresión de mRNA asociados al KO de *KDM6B*. **42**

**Figura 8.** Tiempo promedio de permanencia en la rueda giratoria de ratones *KDM6B* KO. **44**

**Figura 9.** Prueba de campo abierto en ratones *KDM6B* KO. **46**

**Figura 10.** Prueba de luz y oscuridad en animales *KDM6B* KO. **47**

**Figura 11.** Prueba del laberinto cero elevado en ratones *KDM6B* KO. **49**

**Figura 12**. Prueba de enterramiento de canicas en animales *KDM6B* KO. **50**

**Figura 13.** Prueba de las tres cámaras en ratones *KDM6B* KO. **52**

**Figura 14.** Prueba de interacciones sociales en animales *KDM6B* KO. **53**

**Figura 15.** Prueba de la dominancia del tubo en ratones *KDM6B* KO. **55**

**Figura 16**. Prueba de condicionamiento al miedo en animales *KDM6B* KO. **58**

**Figura 17.** Prueba de Laberinto de Barnes en ratones *KDM6B* KO. **59**

**Figura 18.** Expresión relativa de *KMT2C* en animales. **62**

**Figura 19.** Inmunofluorescencia representativa de condición control y *KMT2C* KO contra *KMT2C*. **63**

**Figura 20.** Western blots representativos de *KMT2C* KO. **64**

**Figura 21.** Cambio de expresión en mRNA de *KMT2D* en animales *KMT2C* KO. **66**

**Figura 22.** Edición del genoma en animales *KMT2C* KO. **67**

**Figura 23.** Cambios de expresión de mRNA asociados al KO de *KMT2C.* **68**

**Figura 24.** Tiempo promedio de permanencia en la rueda giratoria de ratones *KMT2C* KO. **70**

**Figura 25.** Prueba de campo abierto en ratones *KMT2C* KO. **72**

**Figura 26.** Prueba de luz y oscuridad en animales *KMT2C* KO. **73**

**Figura 27.** Prueba del laberinto cero elevado en ratones *KMT2C* KO. **75**

**Figura 28**. Prueba de enterramiento de canicas en animales *KMT2C* KO. **76**

**Figura 29.** Prueba de las tres cámaras en ratones *KMT2C* KO. **78**

**Figura 30.** Prueba de interacciones sociales en animales *KMT2C* KO. **79**

**Figura 31.** Prueba de la dominancia del tubo en ratones *KMT2C* KO. **81**

**Figura 32**. Prueba de condicionamiento al miedo en animales *KMT2C* KO. **83**

**Figura 33.** Prueba de Laberinto de Barnes en ratones *KMT2C* KO. **84**

**Figura 34.** Comportamientos asociados a las condiciones *KDM6B* KO y *KMT2C* KO. **96**

## Tablas

**Tabla 1.** Listado de partidores utilizados para medir niveles de ARNm por RT-qPCR. **28**

**Tabla 2.** Valores de expresión relativa a GAPDH de animales *KDM6B* KO. **36**

**Tabla 3.** Valores de expresión relativa a GAPDH de animales *KMT2C* KO **61**

## Listado de Abreviaturas

**AAV:** Virus adenoasociado

**ADNc:** ADN complementario

**H3:** Histona 3

**H3K4me1:** Monometilación de la lisina 4 de la Histona 3

**H3K4me3:** Trimetilación de la lisina 4 de la Histona 3

**H3K27me3:** Trimetilación de la lisina 27 de la Histona 3

**KO:** *Knockout*

**ARNg:** ARN guía

**TEA:** Trastorno del Espectro Autista

## I. Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) es una condición altamente variable caracterizada por déficits en interacciones sociales y comunicación, comportamientos repetitivos e intereses restringidos que pueden estar asociados con comorbilidades psiquiátricas, neurológicas, físicas y/o discapacidad intelectual. Recientemente en Chile se publicó un estudio donde se determinó una prevalencia de 1 cada 51 niños. Diversos estudios han tratado de identificar un solo gen mutado que podría explicar el fenotipo observado en sujetos con TEA. Sin embargo, hasta la fecha hay más de 1000 genes que han sido asociados al TEA. Entre esos genes, se encuentran algunos que codifican para enzimas remodeladoras de la cromatina que cuando se encuentran mutados y pierden su función se han relacionado fuertemente con el TEA. En esta investigación caracterizamos el rol y los fenotipos de comportamiento producidos en ratones a través del *knockout* (KO) de las enzimas modificadoras de colas de histonas *KDM6B* y *KMT2C*. Si bien ambos genes están asociados al TEA, no se sabe cómo se produce este trastorno cuando existe una pérdida de función, ni tampoco qué genes están cambiando su expresión al cambiar el perfil epigenético.

Para determinar el rol de estas enzimas en TEA, se utilizó el sistema CRISPR/Cas9 para generar KOs de *KDM6B* y *KMT2C* a través de inyecciones intracerebroventriculares en ratones Cas9 *knock-in* (KI) en el día postnatal 0 (P0) con AAV que codifican para ARN guía (ARNg). Se realizó una batería de 10 pruebas conductuales a P>80 para evaluar ansiedad, sociabilidad, conductas repetitivas, entre otras. También se determinaron los cambios en las marcas de histonas asociadas a *KDM6B* como H3K27me3 y para *KMT2C* H3K4me1,3. La expresión de marcas epigenéticas se analizó mediante western blot, los niveles de ARNm mediante RT-qPCR y expresión de las enzimas por inmunofluorescencia.

La administración sistémica de virus adenoasociados (AAV) produjo una fuerte reducción de los niveles de ARNm y proteína de *KDM6B* o *KMT2C* en la corteza cerebral y también alteración en la modificación de histonas asociada a *KDM6B,* H3K27me3. Los análisis conductuales muestran

comportamientos repetitivos y dominancia en animales *KDM6B* y *KMT2C* KO. Además, los ratones *KDM6B* KO mostraron una menor ansiedad, interacciones sociales reducidas, una mayor capacidad motora e hiperactividad. Por otro lado, los animales *KMT2C* KO tienen ansiedad aumentada, comportamiento exploratorio reducido, formación de memoria y aprendizaje levemente reducido. Luego, en las pruebas moleculares demostramos que ocurre una baja en la expresión del mRNA y proteínas en las condiciones *KDM6B* KO y *KMT2C* KO, así como un aumento en la marca H3K27me3.

Nuestros hallazgos brindan información sobre cómo la pérdida de función de *KDM6B* o *KMT2C* producen comportamientos similares al fenotipo TEA en ratones que se asemejan a individuos con TEA. También se encontró que disminuye la expresión de genes asociados a la madurez neuronal mediante RT-qPCR, cuando *KDM6B* o *KMT2C* se encuentra KO. Proponemos que estos comportamientos son consecuencia de alteraciones en la expresión de un grupo de genes relacionados con el neurodesarrollo que proponemos podrán ser dilucidados mediante RNA-Seq.

## II. Introducción

### Trastorno del Espectro Autista y su origen genético

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es una condición muy variable caracterizada por déficits en interacciones sociales y comunicación, comportamientos repetitivos e intereses restringidos, que pueden estar asociados con comorbilidades psiquiátricas, neurológicas, físicas y/o discapacidad intelectual (Feliciano et al., 2019; Yuen et al., 2017). Este trastorno del desarrollo neurológico tiene una prevalencia de 1 cada 54 niños en Estados Unidos (Maenner et al., 2020). En Chile, se reportó en el año 2021 un estudio que da cuenta que la prevalencia en el país es de 1 en 51 niños en dos comunas de la Región Metropolitana (Yáñez et al., 2021), lo que podría ser representativo de lo que ocurre a nivel país.

La genética es un factor importante que contribuye a la aparición de TEA, debido a que los genes defectuosos pueden transmitirse a la descendencia o adquirirse mediante una mutación *de novo*. Se han encontrado múltiples genes candidatos asociados al TEA que debido a las mutaciones alteran o pierden su función al cambiar el marco de lectura o generando codones de término prematuros (Iossifov et al., 2012).

La base de datos SFARI GENE (Banerjee-Basu & Packer, 2010) agrupa diversos genes candidatos en una lista con distintos puntajes según la evidencia y los avances en la investigación del TEA. Interesantemente las mutaciones que están asociadas a TEA se encuentran distribuidas en todos los cromosomas humanos. Dentro de estas mutaciones se han descrito las que producen cambios en las regiones codificantes para las enzimas *KDM6B* y *KMT2C.* Estos son considerados genes de alta confianza, debido principalmente a que se ha encontrado que en pacientes con TEA existe una pérdida de función de estas proteínas, afectando así su función demetilasa y metiltransferasa respectivamente (Stolerman et al. 2019; Koemans et al., 2017). Además, un estudio de asociación en más de 33 mil pacientes con TEA a 102 nuevos genes que estarían asociados al TEA. También incluye a *KDM6B* y

*KMT2C* (Satterstrom et al., 2020), ambas enzimas que proponemos estudiar en este trabajo para determinar cómo producen TEA, posiblemente debido a cambios en el desarrollo y neurobiología de los individuos.

**Organización del material genético en células eucariontes y epigenética**

El ADN es el material genético que codifica toda la información de un organismo. El genoma eucarionte se encuentra organizado dentro de la célula a través de la interacción con histonas resultando su organización en nucleosomas que se componen de un par de cada histona H2A, H2B, H3 y H4 (Komberg & Lorch, 1999). Los cromosomas son producto de la compactación y organización del complejo histona-ADN o también conocido como cromatina (Komberg & Lorch, 1999). La cromatina puede estar en forma de heterocromatina, donde la información contenida está condensada y no está disponible para ser transcrita, o como eucromatina, donde el ADN se encuentra relajado y se mantiene accesible para la transcripción, aquí los genes se pueden activar o desactivar y el ADN se puede reparar o replicar (Grewal & Moazed, 2012). Las células cambian de manera constante y dinámica el estado de la cromatina en respuesta a estímulos internos y externos. Dichos cambios son modulados por la expresión génica que requiere de la participación de enzimas modificadoras de la cromatina y de factores de transcripción unidos al ADN (Kouzarides, 2007; Krishnakumar & Blelloch, 2013).

La epigenética hace referencia a los mecanismos que producen cambios heredables en las histonas y ADN que no implican una modificación en la secuencia de nucleótidos, sino que modifican la estructura y condensación de la cromatina afectando la expresión génica y el fenotipo (García et al., 2012). Los mecanismos de modificación epigenética incluyen: metilación del ADN, ARNs no codificantes y modificaciones de las colas de las histonas (Rutten & Mill, 2009). Dando énfasis en ésta última, las histonas poseen colas N-terminales que sobresalen del nucleosoma y están sujetas a diversas modificaciones postraduccionales, llevadas a cabo por distintas enzimas que pueden metilar,

acetilar, fosforilar, entre otros, a los distintos residuos lo que se conoce como código de histonas (Rutten & Mill, 2009).

**Modificaciones covalentes de las colas de histonas**

Existen tres tipos de enzimas clave que están asociadas a estas modificaciones: (a) escritoras: capaces de modificar o marcar químicamente los residuos de las histonas, (b) borradoras: remueven dichas marcas y (c) lectoras: reconocen las marcas epigenéticas (Biswas & Rao, 2018). En este estudio se abordará el rol de enzimas que escriben o borran marcas de metilación en las colas de histonas H3 que se relacionan con la activación o represión transcripcional (Wolffe, 1994). La metilación de las colas de histonas puede tener tres grados: mono-, di- o tri- metilación. Generalmente esta modificación se asocia con represión transcripcional, pero el efecto dependerá del grado de metilación y la ubicación del residuo (Greer & Shi, 2012). Por ejemplo, cualquier grado de metilación en H3K4 se asocia a activación transcripcional y así también la mono metilación de H3K27, en cambio la di- o tri-metilación en este residuo se ha relacionado con represión transcripcional (Barski et al., 2007).

Entre las enzimas que remueven las metilaciones se encuentran las de la familia *KDM6* que corresponden a demetilasas específicas de la Lisina 27 de la Histona 3 (H3K27), un ejemplo es *KDM6B* que remueve las marcas de H3K27me3 asociadas a represión transcripcional (Figura 1A), siendo antagonista del complejo Polycomb 2 (PRC2) (Tang et al., 2020). Se ha descrito que *KDM6B* es reclutada en conjunto con la acetiltransferasa p300 por los promotores unidos a p53 para remover los niveles de H3K27me3 y también interactúa con el complejo SWI/SNF que corresponde a una subfamilia de complejos remodeladores de la cromatina dependiente de ATP para promover la expresión génica (Williams et al, 2014; Farzaneh et al., 2022). Las marcas H3K27me3 son catalizadas por el complejo represor 2 PRC2, reduciendo la accesibilidad de factores de transcripción y maquinarias remodeladoras de cromatina (Veneti et al., 2017). Genes asociados a la acción epigenética del complejo PRC2 se han relacionado con la maduración de células hipocampales en

mamíferos, lo que involucra la regulación sináptica y plasticidad (Henriquez et al., 2013). Además se ha descrito que alteraciones en las modificaciones epigenéticas o en las enzimas que las escriben o borran, pueden llevar a desórdenes cognitivos que afecten el aprendizaje y la memoria (Day & Sweatt., 2011). En particular, se ha demostrado que *KDM6B* juega un rol importante en la regulación epigenética de la expresión de genes involucrados en el desarrollo, plasticidad celular, sistema inmune, enfermedades neurodegenerativas y un rol dual en cáncer (Burchfield et al., 2015; Farzaneh et al., 2022). Variantes genéticas de *KDM6B* se han asociado a retrasos en el neurodesarrollo y rasgos dismórficos (Stolerman et al., 2019). También estudios recientes han encontrado que en ratones haploinsuficientes para *KDM6B* provoca alteraciones de comportamiento que se asemejan al TEA y trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Gao et al., 2022). *KDM6B* se ha reportado que está enriquecido en enhancers de transcripción neuronal, modulando la neurogénesis postnatal y adulta al controlar cientos en enhancers (Park et al., 2014). Es de esperar que el KO de *KDM6B* produzca pérdida de la función demetilasa de esta enzima y por lo tanto cambios en la marca epigenética H3K27me3 como se indica en la Figura 1A.

Otra enzima que se ha visto involucrada en procesos de regulación de expresión génica es *KMT2C* que tiene función metiltransferasa y deposita la marca H3K4me1 que se encuentra asociada a enhancers activos o H3K4me3 relacionada a regiones activas transcripcionalmente (Figura 1B) (Jozwik et al., 2016). *KMT2C* pertenece al complejo COMPASS, donde interactúa con el subcomplejo WRAD, específicamente con el dominio SET para aumentar la actividad metiltransferasa hasta 600 veces, lo que contribuye a funciones esenciales en vías de señalización del desarrollo en eucariontes (Lavery et al., 2020; Fagan & Dingwall, 2019). Esta enzima es reclutada a *enhancers* por interacciones con factores de transcripción secuencia-específica (Fagan & Dingwall, 2019). Para que esto ocurra, es necesario que exista una acetilación en H3K27 mediada por la histona acetiltansferasa p300/CBP que es reclutada por interacciones directas con el complejo COMPASS al que pertenece *KMT2C* (Lai et al., 2017). La marca H3K4me1 producida por *KMT2C* establece la identidad de los *enhancers*, pero

para una completa activación es necesario que además de la acetilación de H3K27, se remuevan las metilaciones catalizadas por PRC2 por lo que *KDM6B* asiste al complejo COMPASS demetilando las marcas para activar los *enhancers* (Maury & Hashizume, 2017). *KMT2C* se ha encontrado mutada en individuos con discapacidad intelectual y TEA (Koemans et al., 2017). Particularmente, con el KO de *KMT2C* esperamos observar cambios en las marcas H3K4me1 y H3K4me3 ya que se vería alterada su función metiltransferasa como se esquematiza en la Figura 1B. Dentro del contexto del TEA, los genes que codifican para las enzimas *KDM6B* y *KMT2C* son considerados de alta confianza, debido principalmente a que se ha encontrado que en pacientes con TEA existe una pérdida de función de estas proteínas, afectando así su función demetilasa y metilasa respectivamente (Stolerman et al., 2019; Koemans et al., 2017). Además, un estudio reciente ha relacionado a ambas enzimas *KDM6B* y *KMT2C* con cambios en el desarrollo y función en la neurobiología del autismo (Satterstrom et al., 2020).

Un factor importante a considerar es que existen diversas familias de enzimas que catalizan o remueven marcas en las colas de histonas. Por ejemplo, la familia *Mll* a la que pertenece *KMT2C* donde se ha descrito que la pérdida de función de uno de los miembros puede ser compensada por otra enzima de la familia de metilasas de H3K4, esto puede afectar los niveles de las marcas de ciertos promotores de genes (Wang et al., 2009a). En el caso de *KDM6B*, se ha descrito que en mamíferos puede existir una redundancia en los miembros de la familia *KDM6*. También se ha reportado que deben existir mecanismos compensatorios para la pérdida de *KDM6B* con el fin de que cumpla su función como regulador epigenético en el desarrollo, se ha visto que en la diferenciación de células madre embrionarias a mesodermo, *KDM6B* puede compensar parcialmente la pérdida de *KDM6A* reduciendo los niveles de metilación de la marca H3K27me3 (Tran et al., 2020; Burchfield et al., 2015). De esta manera, se debe considerar que al realizar el KO de *KDM6B* y *KMT2C* probablemente las marcas epigenéticas asociadas a estas enzimas podrían aumentar o disminuir de una forma más atenuada debido al efecto compensatorio por parte de otras enzimas.

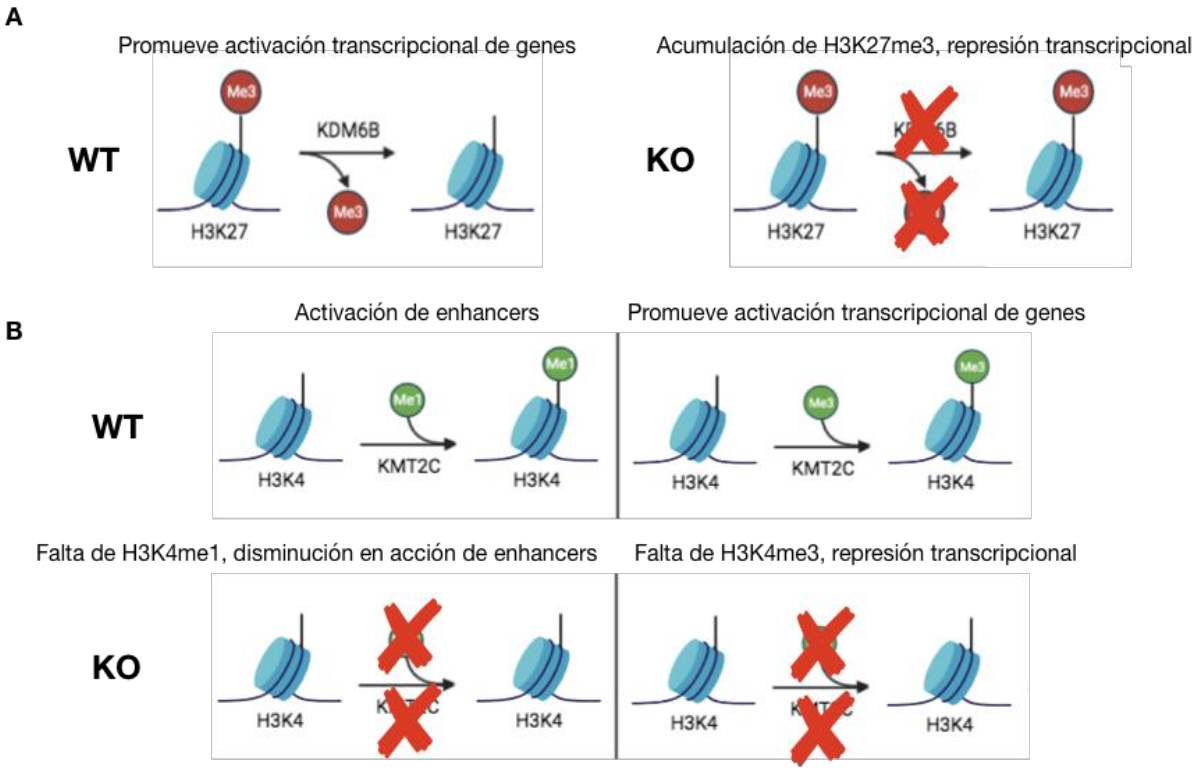



**Figura 1. Función de *KDM6B* y *KMT2C* sobre las modificaciones covalentes en las colas de histonas y efecto esperado luego del KO. A)** Esquema representativo de la función de *KDM6B* en un organismo WT, donde ejerce su función demetilasa borrando la marca represora H3K27me3 y promoviendo la activación transcripcional de genes. Por el otro lado, se esquematiza el efecto esperado donde el KO provocaría que se acumule la marca H3K27me3 llevando así a la represión transcripcional. **B)** Esquema representativo de la función de *KMT2C* en un organismo WT, en donde *KMT2C* cataliza la monometilación o trimetilación el residuo H3K4 con el fin de activar enhancers o promover la activación transcripcional de genes. En la condición *KMT2C* KO se espera que la enzima no pueda ejercer su acción metiltransferasa, por lo que no se acumulará H3K4me1 ni H3K4me3, provocando una posible disminución en la acción de ciertos *enhancers* y promoviendo la represión transcripcional.

**TEA asociado a disfunción de enzimas que regulan la expresión génica**

Recientemente, se han descrito múltiples genes que pueden estar asociados a TEA, donde un gran porcentaje de ellos corresponde a genes que regulan la expresión génica (Satterstrom et al., 2020). Entre ellos se encuentra *UTX* también conocida como *KDM6A*, una enzima que pertenece a la misma familia que KDM6B con función demetilasa específica de H3K27me3. *UTX* se expresa en la mayoría de las regiones del cerebro, y se ha determinado que la demetilación mediada por *UTX* tiene un rol crítico en el desarrollo del cerebro (Tang et al., 2020). En pacientes diagnosticados con el síndrome Kabuki se ha determinado la pérdida de función de *UTX*. Este síndrome tiene como principales características rasgos faciales distintivos, retraso en el desarrollo, discapacidad intelectual leve a moderada, retardo en crecimiento post natal, entre otros (Lederer et al., 2012). Además, se ha descrito que modelos murinos KO para *UTX* muestran comportamientos del tipo ansioso, déficits en aprendizaje y memoria. A nivel fisiológico y celular mostraron una transmisión sináptica y morfología neuronal anormal. También, análisis bioinformáticos revelaron que la falta de demetilación por *UTX* suprime la expresión de genes involucrados en la regulación de morfología neuronal y actividad sináptica (Tang et al., 2020), características que se asemejan a un fenotipo del TEA. Además, se han encontrado pacientes que padecen en simultáneo el síndrome Kabuki y TEA, teniendo en común mutaciones en los cromosomas 8, 15 y X (Sertçelik et al., 2016). Creemos que debido a la gran homología entre *KDM6A* y *KDM6B*, la pérdida de función de *KDM6B* también podría llevar a un fenotipo similar al de TEA.

Otro ejemplo de genes fuertemente asociado a TEA es *CHD8*, correspondiente a la proteína de dominio cromo-helicasa 8 que codifica para un remodelador de la cromatina dependiente de ATP que se una a la marca H3K4me3 presente en promotores activos (Cotney et al., 2015). Tiene un importante rol en el cerebro y regula varios genes asociados al neurodesarrollo y funciones sinápticas. Modelos murinos con mutaciones de pérdida de función de *CHD8* presentaron macrocefalia,

anormalidades cráneo faciales y déficits en comportamiento. Esta información en conjunto con datos de electrofisiología, confirman la contribución de *CHD8* en el TEA (Platt et al., 2017).

**Maduración neuronal y TEA**

Dentro de los genes asociados al TEA, se han encontrado grupos que participan en procesos biológicos como proliferación neuronal, migración, regulación de etapas del desarrollo cerebral, madurez neuronal y sináptica. Particularmente la madurez neuronal se ve fuertemente afectada en individuos con TEA, influyendo en la formación y función de sinapsis y neuritas teniendo su origen en las etapas tempranas del neurodesarrollo (Casanova & Casanova, 2014). Incluyendo procesos de transmisión de señales, refinamiento de la sinapsis para así optimizar los circuitos neuronales y establecimiento de mecanismos para el mantenimiento y preservación de la función de los circuitos (Bradke et al., 2020). Es posible estudiar este estado mediante el análisis de marcadores de madurez e inmadurez sináptica utilizando marcadores de neuronas inmaduras se puede determinar la expresión de *DCX* y *NR2B*, y de neuronas maduras la expresión de *PSD95*, *NeuN*, *NR2A* y *KCC2b*. Donde *DCX* está involucrado en la formación y regulación de microtúbulos, jugando un rol importante en el cerebro en desarrollo (Reiner, 2013). *NeuN* es un regulador de la diferenciación neuronal, fundamental para el desarrollo del cerebro (Lin et al., 2016). El receptor *NR2B* promueve la reorganización estructural de las conexiones neuronales y *NR2A* facilita su estabilidad (Bustos et al., 2014). *PSD95,* se asocia a la regulación en la maduración sináptica y plasticidad (Bustos et al., 2014). *KCC2b*, es un transportador esencial para la modulación de la transmisión sináptica inhibitoria, cuya expresión aumenta en el desarrollo temprano del cerebro (Jones et al., 2022),

**Tecnologías actuales como herramientas en biomedicina**

El sistema CRISPR/Cas9 se compone de una endonucleasa Cas9, que corta las hebras de ADN y de un ARN guía (ARNg) que es complementario a una de las hebras del ADN, que permite dirigir a Cas9 al sitio de interés (Mali et al., 2013). Así se puede editar un gen tras la expresión de un ARNg y Cas9 mediante la infección de células con partículas de virus adenoasociados (AAV) (Platt et al., 2014). Una de las aplicaciones de CRISPR es producir KOs de genes, lo que provoca una mutación de desplazamiento del marco de lectura por una inserción o deleción específica que puede interrumpir la función del gen, causando un degradación de los ARNm y el KO de la proteína (Shalem et al., 2013).

Por otro lado, un transcriptoma es el conjunto completo de transcritos de una célula y su cantidad, para una etapa del desarrollo o condición específica. Se pueden detectar todas las especies de transcritos, como: ARNm, ARNs no codificantes, ARN pequeños, entre otros. (Wang et al., 2009b). Para esto es necesario producir ADN complementario a partir de ARN, construir bibliotecas y secuenciar, seguido del uso diversas herramientas bioinformáticas (Han et al., 2015). Los análisis de transcriptoma han adquirido un papel clave en la identificación de los mecanismos responsables de enfermedades complejas, lo que ha permitido estudiar cáncer, interacciones hospedero-patógeno y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Costa et al., 2012).

Con esta información y tecnología disponible, generamos modelos murinos KO para *KDM6B* y *KMT2C* que fueron sometidos a una batería de pruebas de comportamiento para determinar si es que se produce un fenotipo del tipo TEA. A futuro esperamos identificar la expresión diferencial de genes al comparar con la condición control a través de RNA-Seq, similar a la publicación de Tang et al., 2020 con *KDM6A*. Ya que, si bien se sabe que *KDM6B* y *KMT2C* están asociados al TEA, aún no está claro cuáles son los mecanismos involucrados y que ocurre con la expresión de otros genes en consecuencia a su disfunción.

## III. Hipótesis y Objetivos

El trastorno del espectro autista (TEA) es una condición altamente variable caracterizada por déficits en interacciones sociales y comunicación, comportamientos repetitivos e intereses restringidos que pueden estar asociados con comorbilidades psiquiátricas, neurológicas, físicas y/o discapacidad intelectual. Estudios recientes han permitido conocer múltiples genes candidatos asociados al TEA que debido a las mutaciones *de novo* alteran o pierden su función, cambiando el marco de lectura y generando codones de término. Dos de ellas fueron estudiadas en esta investigación: *KDM6B* que es una demetilasa específica de H3K27me3 y *KMT2C* que tiene función metiltransferasa de H3K4me1/3. Ambas enzimas promueven el estado de eucromatina, y por lo tanto la activación transcripcional de genes. Con esta información y la tecnología CRISPR/Cas9 disponible en el laboratorio, buscamos identificar cambios en las marcas epigenéticas y la disminución de la expresión de los genes estudiados en ratones KO a los que se les estudiará su comportamiento para determinar si existe un fenotipo de TEA a través de una batería de pruebas. Si bien se sabe que *KDM6B* y *KMT2C* están asociados al TEA, aún no está claro cuáles son los mecanismos involucrados y que ocurre con la expresión de otros genes en consecuencia a su disfunción.

Por lo anterior, se propone como hipótesis que: **"La pérdida de función de las enzimas modificadoras de histonas *KDM6B* y *KMT2C* generan cambios en la expresión de genes relacionados a madurez neuronal que llevan a la aparición de fenotipos asociados a TEA en ratones"**.

## Objetivo General

Determinar el rol de las enzimas *KDM6B* y *KMT2C* en el desarrollo del Trastorno del Espectro Autista.

## Objetivos Específicos

1. Analizar el rol de la enzima *KDM6B* en el desarrollo de un fenotipo de TEA en ratones KO.
    1.1. Analizar cambios de expresión y cambios en las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas asociadas a la pérdida de función de *KDM6B*.
    1.2. Determinar la aparición de comportamientos tipo TEA en animales *KDM6B* KO.

2. Analizar el rol de la enzima *KMT2C* en el desarrollo de un fenotipo de TEA en ratones KO.
    2.1. Analizar cambios de expresión y cambios en las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas asociadas a la pérdida de función de *KMT2C*.
    2.2. Determinar la aparición de comportamientos tipo TEA en animales *KMT2C* KO.

## IV. Materiales y Métodos

### Diseño experimental

Para evaluar el comportamiento que provoca el KO de *KDM6B* y *KMT2C* en ratones, animales a P0 fueron inyectados con partículas virales AAV con o sin (control) ARNg contra esas enzimas. Luego de que la edición genómica se estabilizó en el animal (8 semanas), fueron sometidos a pruebas de comportamiento para evaluar si presentan un fenotipo de TEA. La batería de pruebas incluye: Rotarod para observar capacidad locomotora de los animales, enterramiento de canicas, campo abierto, cambios de luz/oscuridad y laberinto cero elevado para evaluar comportamientos ansiosos y repetitivos a través de trayectorias. Para la formación de memoria: laberinto de Barnes y condicionamiento contextual del miedo, según tiempo de llegada al objetivo y reacción a estímulos, respectivamente. Interacciones sociales/comportamientos agresivos: prueba de dominancia del tubo, 3 cámaras e interacciones sociales.

### Producción de AAV

Para la producción de partículas virales concentradas del tipo adeno asociadas (AAV) que contienen el ARNg contra *KDM6B y KMT2C*, la proteína fluorescente roja tdTomato, promotor hSyn y cápside PHP.eB (Bedbrook et al., 2018; Chan et al., 2017). Se necesitaron 10 placas de cultivo de células HEK 293T suplementadas con DMEM 10% FBS hasta obtener confluencia del ~70% o 6 x$10^4$ células/$cm^2$ aproximadamente, por cada AAV. A las 24 h, se transfectaron las células con 440 µL de Optimem, 150 µL de PEI, 22.8 µg de plásmido de cápside PHP.eB, 5.7 µg del vector viral vacío o que contiene el ARNg contra *KDM6B* o *KMT2C* y tdTomato, y por último 11.4 µg de plásmido helper DF6. Luego de 24 h de transfección, se cambió el medio por DMEM 1% FBS. Transcurridas 72 h, se colectó el medio de las placas y se guardó a 4 ºC en tubos cónicos de 250 mL, se renovó el medio de las placas con DMEM 1% FBS fresco. Para la colección de virus, a las 120 h luego de la transfección,

se transfirió el medio en conjunto con las células que fueron soltadas con el mismo medio y se traspasaron a tubos cónicos de 250 mL. Se centrifugaron los tubos a 2000 g por 10 min a 4 ºC. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo cónico y el pellet se resuspendió en buffer de digestión SAN (5 mL de 40 mM Tris, 500 mM NaCl y 2 mM $MgCl_2$ pH 8.0) con Nucleasa Activa en Sal (SAN, Arcticzymes) a 100 U/mL y se incubó a 37 ºC por 1 hora. A los dos tubos con sobrenadante guardados se les agregó 40 mL de una solución stock de 5x PEG 8000 (Sigma) al 40% disuelto en NaCl 2.5 M (la concentración final fue 8% PEG 8000 y NaCl 500 mM) y se incubaron en hielo durante 2 h. Luego se centrifugaron a 4000 g por 30 min a 4 ºC, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con buffer de digestión SAN. Se recolectaron todos los pellets en un mismo tubo y se almacenó a 4 ºC hasta su purificación. Luego se realizó un gradiente de iodixanol de 15%-25%-40%-60% para cargar el pellet disuelto en buffer SAN, y se ultracentrífugó a 41000 rpm durante 4 h. Finalmente, con una jeringa se recolectó el virus concentrado y puro, se alicuotó y fue almacenado a -80 ºC hasta su uso.

**Animales experimentales y administración de partículas virales AAV**

Se utilizarán ratones C57BL/6 (B6) Cas9 KI (Jackson Laboratories stock #026179). El manejo y uso de animales se realizó de acuerdo con lo estipulado por el comité de bioética de la Universidad Andrés Bello y ANID. Los animales utilizados permiten una expresión temprana y duradera de ARNg lo que facilita la edición genética en todo el cerebro (Kim et al., 2016). Se inyectaron 15-16 animales P0 por condición con virus AAV altamente puros codificantes para proteína fluorescente tdTomato sola (control) o en conjunto con ARNg contra el exón 6 de *KDM6B* o el exón 3 de *KMT2C*. Los ARNg fueron previamente diseñados y probados en estudios del laboratorio en cultivos *in vitro* de neuronas (Brauer, 2022). Las secuencias correspondientes a los ARNg son: *Kdm6b ex6-4* 5' GGGAAGTTGGAATCCCTACA 3' y *Kmt2c ex3-2* 5' GAGGATGCTGAAACAGAAG 3'. Los animales fueron previamente preparados para recibir la inyección con crioanestesia. Luego de que el

animal dejó de moverse, se inyectó una solución de AAV diluido en PBS estéril utilizando una jeringa Hamilton de 10 μL (Hamilton, 7653-01) con aguja calibre 32 (Hamilton, 7803-04, RN 6PK PT4). La inyección fué a dos quintos de distancia desde la intersección lambda del cráneo hasta los ojos del animal. La aguja se mantuvo perpendicular a la superficie del cráneo y se introdujo aproximadamente 3 mm. Una vez que la aguja fue insertada, se inyectó 1 μL de solución viral a cada ventrículo lateral y posteriormente el animal se trasladó a una almohadilla térmica hasta que recuperó su color normal y movimiento, se devolvió a la caja donde habita su madre para continuar su crecimiento y desarrollo. Al día siguiente se verificó que las crías sobrevivieron y se visitaban al menos 2 veces por semana. Cuando los animales inyectados alcanzaron aproximadamente un mes de vida, se les implantó un microchip (p-chip, Pharmaseq USA) en la cola para su posterior identificación y seguimiento en las pruebas de comportamiento. Luego se separaron los animales por sexo y condición para ser distribuidos en jaulas con identificador para su posterior uso. Las jaulas estaban en una habitación con ciclo de luz/oscuridad 12/12 con comida y agua ilimitada.

**Pruebas de comportamiento**

Tras 8 semanas post inyección con AAV, se comenzó a realizar la batería de tests de comportamiento para determinar si existía un fenotipo del tipo TEA en los animales inyectados con el ARNg contra *KDM6B* y *KMT2C*, y sin ARNg como control. Las pruebas fueron grabadas y monitoreadas con el software ANY-maze (Stoelting, USA).

1. **Rotarod**

Se utilizó para estudiar la motricidad y capacidad locomotora de los animales con el fin de observar si es que existían o no diferencias en su desplazamiento. La prueba consiste en posar a los

animales sobre una varilla giratoria con una velocidad inicial de 4 rpm y aceleración 20 rpm/min, y se registra el tiempo promedio que permanecen en ella en 3 intentos con descanso de al menos 10 min entre cada ronda.

**2. Campo abierto**

La exploración espontánea y comportamientos ansiosos se midieron en un campo abierto. El escenario es una arena cuadrada de 45×45×45 cm. Los ratones fueron colocados individualmente en el centro y exploraron libremente durante 10 min. El tiempo transcurrido en el cuadrado central de 20 $cm^2$ del campo abierto se registró como tiempo central, y se graficó la trayectoria de los animales.

**3. Cambios de luz/oscuridad**

Para la prueba de luz/oscuridad se utilizó una caja de 30×30×30 cm dividida en dos, donde un lado es cerrado y oscuro de acrílico negro opaco con una pequeña abertura, y el otro lado es abierto e iluminado. Los ratones fueron puestos en el lado oscuro y se les permitió moverse libremente durante 10 minutos. Se registró el número total de transiciones, tiempo transcurrido en oscuridad y actividad horizontal.

**4. Enterramiento de canicas**

Esta prueba refleja comportamientos ansiosos y obsesivos. Para la prueba de entierre de canicas se utilizó la misma arena de campo abierto, pero esta vez se colocó 5 cm de viruta de madera y sobre ella un patrón regular de canicas de vidrio de 7x7, espaciadas uniformemente cada una a unos 4 cm de distancia. Luego se introdujo el ratón dentro de la jaula y se registró el número de canicas enterradas (hasta 2/3 de su profundidad) durante 30 minutos.

**5. Laberinto cero elevado**

Se utilizó para medir comportamientos similares a la ansiedad y exploratorios. El laberinto cero elevado es una plataforma circular elevada de 40x50x5 cm con cuatro cuadrantes. Dos de ellos son cerrados y tienen paredes externas e internas de 27 cm de altura, mientras que los cuadrantes abiertos no poseen pared. Los ratones se posaron en el centro del cuadrante abierto mirando hacia el cuadrante cerrado para permitir la exploración. Se registraron los animales durante 10 min para cuantificar los comportamientos de inmersión de la cabeza y los tiempos pasados en los cuadrantes abiertos y cerrados.

**6. Tres cámaras**

El aparato tiene paredes transparentes y en total mide 61.5×43.5×22 cm. Las dos cámaras laterales en las que se colocan los estímulos miden 20×43.5 cm. Se utilizaron jaulas pequeñas de 8 cm de diámetro y 18 cm de alto en donde para contener al estímulo social o no social. El objeto inanimado que se utilizó como estímulo no social fue un bloque de plástico con forma de pirámide con base circular de 8 x 4 x 4 cm. Para el estímulo social utilizamos ratones *wild type* desconocidos de aproximadamente la misma edad y sexo. La prueba se realizó con 20 lux.

- Día 1, habituación: Se ubicaron las jaulas vacías en las cámaras de los extremos. Se le permitió al ratón explorar libremente por 10 min desde el centro para que se habitúe. Se realizó este procedimiento con cada animal y entre ellos se limpió la estructura y jaulas con etanol 70%.

- Día 2, prueba previa: Se prepararon dos bolas de papel limpias y se dejaron dentro de las jaulas. Luego se dejó explorar libremente a los animales por 10 min.

- Día 3, prueba de preferencia social: Se ubicó un ratón WT en la jaula de la misma edad y sexo del animal de la condición control, *KDM6B* KO o *KMT2C* KO para ser utilizado como estimulo social. El animal de estímulo social se cambió cada 2 pruebas para evitar el agotamiento o la fatiga

social y también se colocó un bloque de plástico en la jaula para ser utilizado como estímulo no social. Se puso al ratón de prueba en el centro del aparato para que explorara 10 min. En simultáneo, el comportamiento del animal fue registrado con una grabadora de video. Se registró la cantidad de tiempo y distancia recorrida en el compartimiento social y no social. Además, se registró el tiempo dedicado a interactuar con el estímulo social y el estímulo no social.

### 7. Interacciones sociales

En esta prueba, un animal de la condición control, *KDM6B* KO o *KMT2C* KO con un animal *wild type* del mismo sexo y edad similar, se dejaron en una caja de 30x30x30 cm por 10 min, donde se monitoreó el comportamiento agresivo (mordidas, montaje o acicalamiento agresivo) y la cantidad de interacciones sociales (olfateo nariz-nariz, nariz-cara, nariz-zona anogenital y acicalamiento) entre ellos.

### 8. Dominancia del tubo

Consiste en un encuentro forzado entre dos animales desconocidos. Se utilizó un tubo transparente de 30 cm de longitud y 3.4 cm de diámetro interior. Se habituaron y entrenaron durante 5 días para que aprendieran a pasar por el tubo. Durante los días de prueba (día 6, 7, 8 y 9), dos ratones del mismo sexo fueron liberados simultáneamente en cada extremo del tubo en tres ocaciones. Se consideró al ratón ganador como el que desplazó fuera del tubo al otro en 2 min. Se registró la cantidad de victorias/derrotas por condición durante 4 días en enfrentamientos aleatorios de animales control versus KO para *KDM6B* o *KMT2C*.

## 9. Condicionamiento al miedo

Ratones adultos fueron sometidos a esta prueba para comprobar la formación de memoria de corto o largo plazo. El entrenamiento consistió en situar al animal en una caja de 30x30x30 cm que posee barras de aluminio en el suelo, durante 5 min. En el día del entrenamiento, se les permitió a los animales explorar la jaula libremente por 2 min, luego se aplicó un tono a 2800 Hz (70 db) por 30 segundos y después un shock eléctrico (2 s, 0.75 mA), luego el animal exploró por 2 min más y se repitió el tono con el shock. Los animales fueron puestos a prueba 24 horas post-entrenamiento para la evaluación de memoria a largo plazo. Durante la prueba, los animales fueron situados en una nueva caja de 35x35x35 cm y se dejaron explorar libremente por 120 s, para luego emitir el sonido por 150 s, luego se repitió la exploración y sonido con los mismos tiempos, sin shock eléctrico. Se registró el tiempo de *freezing* y las veces que el animal se quedó paralizado durante los 2 tonos.

## 10. Laberinto de Barnes

Esta prueba se utilizó para examinar el aprendizaje espacial, memoria y flexibilidad cognitiva. El laberinto de Barnes es una mesa redonda opaca y gris de 91 cm de diámetro con 19 cajas de escape falsas y 1 real. Se ajustó la luz a 1000 lux en el centro de la plataforma, y en las paredes de la sala de conducta se utilizaron tres señales visuales exógenas (largo/ancho ~30 cm) alrededor de la plataforma, circulo negro, triángulo azul, cuadrado amarillo. Todos los animales fueron sometidos a una fase de habituación, entrenamiento y prueba (Sunyer et al., 2007).

- Día 1, habituación: Cada ratón se tomó y ubicó en el centro de la plataforma, se dirigió hacia el orificio de escape orientado hacia el triángulo como señal y se le permitió estar ahí por 1 min. Luego se tomó y dejó explorar libremente por el laberinto por 5 min y nuevamente se le permitió estar por 1 min dentro del orificio de escape (si no entraba dentro de los 5 min, se dirigía hacia él).

- Días 2 a 4, entrenamiento: Cada animal se introdujo dentro de la caja de inicio, se dejó 10 s en el centro de la plataforma, se retiró la caja de inicio y en simultáneo se dió inicio a la reproducción de un sonido de 16000 Hz. La prueba terminó a los 3 min o cuando el ratón encontró el orificio de escape antes de ese tiempo. Se repitió este procedimiento 2 veces por día. En estos días se registró:
    - Número de errores primarios: Cantidad de huecos que el ratón revisó antes de revisar el que corresponde al túnel de escape.
    - Número total de errores: Cantidad total de huecos que el ratón revisó antes de entrar y permanecer en el túnel de escape.
    - Latencia primaria: Tiempo hasta revisar por primera vez el hueco de escape.
    - Latencia total: Tiempo hasta entrar al hueco de escape.
    - Tiempo en la zona de interés
    - Longitud del recorrido primario: Distancia antes de encontrar por primera vez el hueco.
    - Distancia total recorrida.
- Día 5, prueba: Se cambió la posición del túnel de escape orientándolo hacia el cuadrado amarillo y se llevó al animal en la caja de inicio al centro de la plataforma, se dejó 10 s y se dió inicio a la reproducción del sonido. La prueba terminó a los 90 s o cuando el ratón encontró el túnel de escape. Se registró el número de errores primarios y totales, latencia primaria y total, distancia total antes de encontrar el hueco. Se midió también el número de visitas a cada hueco para evidenciar preferencia.

**Preparación de corteza e hipocampo**

Luego de concluir con las pruebas de comportamiento, los animales fueron eutanasiados con isoflurano y se les extrajo corteza e hipocampo para cuantificar los cambios en la expresión de ARNm, proteínas y marcas de histonas asociadas a *KDM6B* y *KMT2C*. Un hemisferio se fijó en PBS 1x-

Paraformaldehido-Sucrosa 4% y el otro se guardó en la solución DNA/RNA Shield (Zymo Research, #R1100) a -80 ºC para realizar las extracciones requeridas.

**Extracción de ARN y RT-qPCR**

El ARN se aisló desde los tejidos con el agente TRIzol (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Para obtener ADN complementario (ADNc) se utilizó 400 ng de ARN y se mezcló con 0.5 µg de Oligo-DT (NEB) en un volumen de 10 µL y se denaturó a 70 ºC por 5 minutos. La transcripción reversa se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, que se compone de: 10 µL de ARN denaturado previamente, 0.5 µL de M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB), 4 µL de Buffer M-MuLV RT 1x (NEB), 0.4 µL de Rnase Inhibitor (NEB), 0.5 µL de dNTPs (Invitrogen) y agua. La mezcla se incubó a 42 ºC por 1 hora y luego 95 ºC por 5 min. Se detuvo la reacción a 4 ºC y se llevó a un volumen final de 100 µL. La cuantificación de ADNc se realizó por qPCR utilizando 3 µL de la mezcla de ADNc, 6 µL Fast Evagreen qPCR Master Mix (Biotium, 31003), 2 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de primers 10 mM con el programa recomendado por el fabricante. La abundancia relativa se midió por el método ddCt utilizando el gen GAPDH como control. La detección de los transcritos se realizó con partidores específicos para los ARN mensajeros (ARNm), las secuencias utilizadas se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Listado de partidores utilizados para medir niveles de ARNm mediante RT-qPCR.

| **Gen** | **Secuencia Fw 5'-3'** | **Secuencia Rv 5'-3'** |
|---|---|---|
| *KDM6B* | TGAAGAACGTCAAGTCCATTGTG | TCCCGCTGTACCTGACAGT |
| *KMT2C* | TGTTCACAGTGTGGTCAATGTT | GAGGGTCTAGGCAGTAGGTATG |
| *GAPDH* | ATGGTGAAGGTCGGTGTGAA | CATTCTCGGCCTTGACTGTG |
| *PSD95* | TGTCTTCATCTTGGTAGCGG | CTCCAATGAAGTCAGAGCCC |
| *NR2A* | TGGAACCTCCAAACTGGAAG | CCTCACAGACTTTCATCCCC |
| *NR2B* | GCCAAACTGGAAGAACATGG | TCTGCTCAGACTCTCACCCC |
| *DCX* | ACTGTGCTGGCGTTGAAGG | CGGGTCCCACATTGCTTAGG |
| *NeuN* | ATCGTAGAGGGACGGAAAATTGA | GTTCCCAGGCTTCTTATTGGTC |
| *KCC2B* | GCCACCATGCTCAACAACCT | TGAAGGGACTGCTCTCTTTGG |
| *KMT2D* | TATGAGGCCACGCGCATCTA | ATCACAAACTCAGGCCGTCCATT |

**Extracción de proteínas nucleares**

Se llevó a cabo el protocolo de extracción nuclear que implica lavar un fragmento de tejido con PBS 1x frío, centrifugar a 5000 rpm por 5 min para descartar sobrenadante, luego agregar 5 volúmenes de Buffer ChIP (50 mM Hepes pH 7.9, 3 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM DTT y cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail 1x, Roche 11836170001) con respecto al pellet, se incubó en hielo 10 min y se evaluó la liberación de núcleos con azul de tripán en un microscopio, luego se homogeneizó con 30 golpes de pistilo, se centrifugó 6000 rpm por 15 min a 4 ºC para separar la fracción citosólica y nuclear. El pellet se resuspendió en 1 volumen del Buffer C (10 mM Hepes pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 25% Glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT y cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail 1x, Roche 11836170001) y se agitó en frío durante 1 hora. Se sonicó 2 rondas al 50% de amplitud en ciclos de 30 s ON/ 30 s OFF, se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 ºC, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80 ºC para posteriormente ser cuantificado por Bradford.

**Western blot**

Se cargaron 10 μg de muestra en un gel denaturante de poliacrilamida al 15% para histonas. Luego se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF activada en metanol y se incubaron con TBS-leche al 5% para bloquear reacciones inespecíficas. Luego se incubaron toda la noche a 4 ºC con una dilución 1:1000 de los anticuerpos primarios: anti H3K27me3 (Sigma-Aldrich, 07-449), H3K4me1 (Diagenode, C15410194) y H3K4me3 (Diagenode, C15410003), todos provenientes de conejo. Como control de carga se utilizó el anticuerpo H3pan (Diagenode C15410324) en una dilución de 1:5000. Luego se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a HRP. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo C-DiGit Li-Cor o film, posterior a su tratamiento con kit de quimioluminiscencia.

**Inmunofluorescencia de tejido**

Secciones coronales del cerebro se cortaron con un vibratomo a un grosor de 80 micras. El primer día se transfirieron las secciones a una placa de 48 pocillos con PBS 1X y se lavaron 3 veces por 5 min en agitación. Luego se bloquearon los tejidos durante 4 h con buffer de Permeabilización/Bloqueo (P/B; PBS 1X, 0.5% Triton X-100, 3% BSA, 3% Donkey Serum) a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró el buffer P/B y se agregó el anticuerpo primario Anti-KMT2C-3 (Millipore, ABE1851) en dilución 1:100 o Anti-KDM6B (Millipore, 07-1533) en dilución 1:500 en buffer P/B para incubar toda la noche a 4 ºC. El segundo día se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con PBS 1X 0.5% Triton X-100 en agitación, para luego agregar el anticuerpo secundario Anti-IgG de Conejo Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, A-21202) a una concentración de 1:500 en buffer 2º (PBS 1X, 0.5% Triton X-100 y 3% BSA) en conjunto con NucBlue (Thermo Fisher, #R37605) diluido 1:500 durante 2 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se lavaron las secciones 3 veces por 5 min con PBS 1X 0.5% Triton X-100. Para el montaje se pasaron las secciones a una placa con PBS 1X, se puso una gota de agua destilada en el portaobjeto y se depositó el tejido en el lugar deseado para luego remover el exceso de agua con papel absorbente. Se agregó 50 µL de medio de montaje Fluoromount G (EMS) y luego el cubreobjeto, se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h en oscuridad y luego se reforzaron los bordes del cubreobjeto con esmalte de uñas transparente. Se mantuvo a 4 ºC hasta su visualización en microscopio. Las imágenes fueron captadas con microscopía confocal Nikon C2+ con objetivo 20x.

**Ensayo Surveyor**

Se llevó a cabo el ensayo Surveyor para determinar si la secuencia de ADN de los animales fue modificada mediante el sistema CRISPR/Cas9. Se amplificó ADN genómico desde corteza con el kit Quick-gDNA Miniprep Kit (Zymo Research, D3025) en un termociclador con los partidores Fw: 5’

CAGGCATTTCTCTCCCAGTC 3' y Rv: 5' GCAAAGGGCAGAGGAAGATT 3' para la condición *KDM6B* KO y Fw: 5' TGGAGTTAGAGTCCTGAGGAGAA 3' y Rv: 5' CACACAGGGGTGTCAAACAT 3' para la condición *KMT2C* KO, luego el producto PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% hasta su resolución. Para llevar a cabo este experimento, se utilizó 500 ng de ADN purificado desde el gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), luego se agregaron 2 µL de 10X NEBuffer 2 (NEB) y se llevó a 19 µL con agua libre de nucleasas, llevó a un termociclador con el siguiente programa: Denaturación inicial 95ºC por 5 min, Alineamiento 95-85º C a -2ºC/segundo y 85-25ºC a -0.1ºC/segundo y luego se mantuvo a 4ºC. Luego se añadió 1 µL de T7 Endonuclease I (NEB, M0302) y se incubó 15 min a 37ºC. Finalmente se preparó un gel de Acrilamida-TBE al 10% (2 mL de Acrilamida 30%, 3.4 mL $H_2O$, 0.6 mL TBE 10x, 0.1 mL PSA 10% y 5 µL TEMED), se cargaron las muestras en el gel y se corrió durante 90 min a 100V, luego el gel se tiñó con GelRed 1x en agua durante 30 min y se visualizó en un transiluminador.

**Análisis de datos**

Los valores se presentan como promedios ± error estándar (ES) para 3 o más experimentos independientes. Los análisis estadísticos fueron realizados con el test de t-Student. Los valores de $p<0.05$ son considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando Graphpad Prism.

## V. Resultados

Para realizar las pruebas de comportamiento, utilizamos virus adenoasociados (AAV) que contienen ARNg contra *KDM6B* y *KMT2C*, cuyas secuencias y ubicación en el genoma se muestra en la Figura 2 y los cuales fueron estandarizados en cultivos corticales primarios de ratón y se escogieron aquellos con mejor eficiencia: Kdm6b ex6-4 y Kmt2c ex3-2 (Brauer, 2022). Estos ARNg, en conjunto con la enzima Cas9 permiten editar el ADN, lo que produce reducciones significativas de los niveles de ARNm y proteína en las células transducidas. Animales Cas9 KI fueron inyectados en estadío P0 de manera intracerebroventricular con virus AAV empaquetados utilizando la cápside PHP.eB (Chan et al., 2017) para realizar el KO de las enzimas de estudio. A partir de la octava semana, comenzamos con una batería de pruebas de comportamiento para medir la ansiedad, memoria, comportamiento repetitivo, sociabilidad, memoria, entre otros. Los comportamientos nombrados se utilizaron para poder identificar rasgos característicos del TEA.

El trabajo se dividió en dos set de 21 y 25 animales para poder tener buen control y manejo de los experimentos. Las pruebas de comportamientos fueron realizadas en todos los animales inyectados. Una vez terminadas las pruebas de comportamiento, los animales fueron eutanasiados. Cabe destacar que los animales incluidos en los análisis estadísticos corresponden a los 15 animales control, y en el caso de los KO sólo se incluyeron a aquellos que presentaron una baja en la expresión de *KDM6B* o *KMT2C* de más de un 50% en su ARNm luego del tratamiento, lo que corresponde a 9 de 16 animales *KDM6B* KO y 9 de 15 animales *KMT2C* KO.

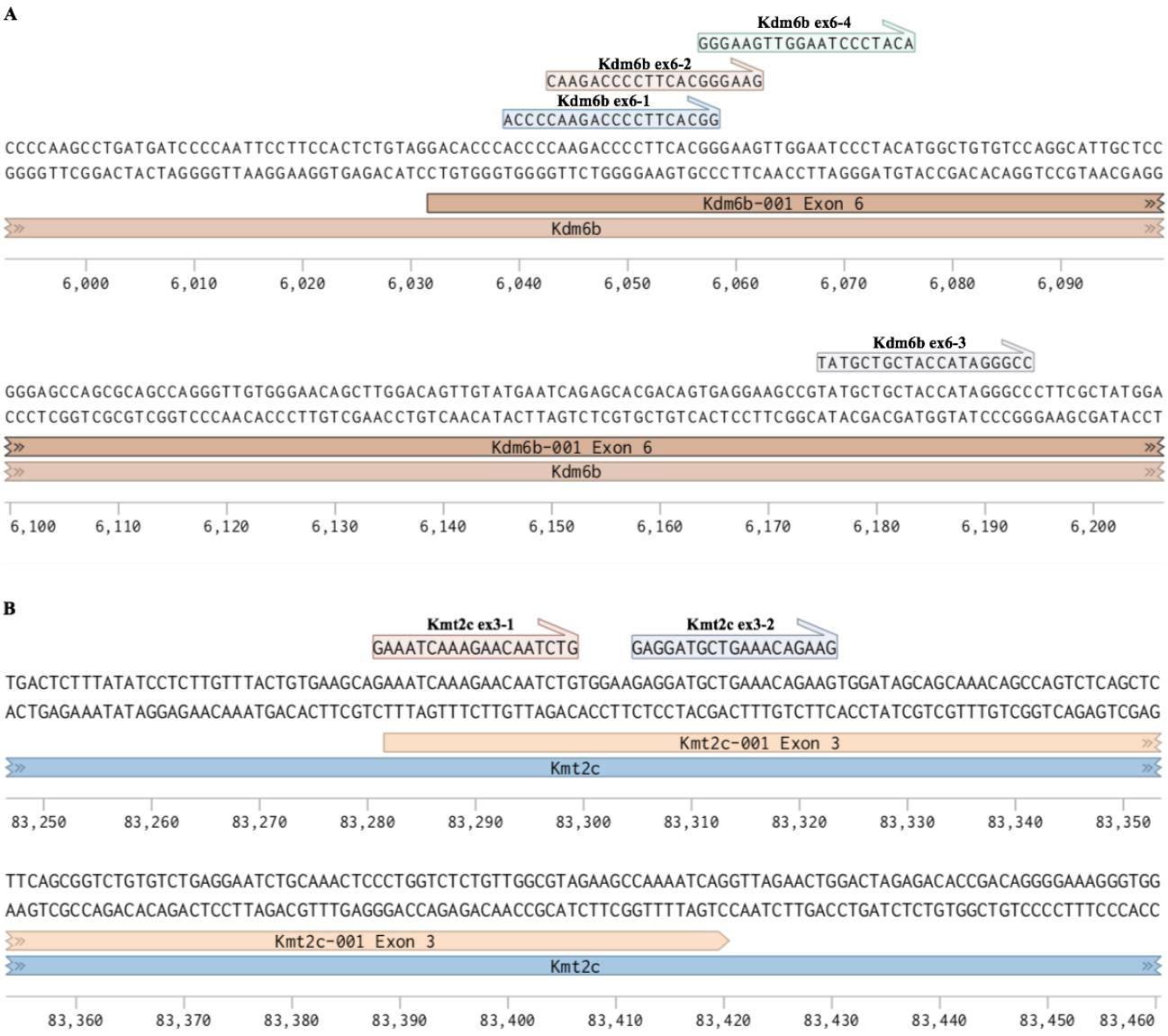



**Figura 2. Secuencias de ARNg y su ubicación en genoma de *Mus musculus.*** Los ARNg están dirigidos contra las secuencias del exón 6 para *KDM6B* como se puede observar A, dónde de 4 ARNg se escogió el Kdm6b ex6-4, en cambio para *KMT2C* se dirigió contra el exón 3 y de 2 ARNg se seleccionó el guía Kmt2c ex3-2 como se muestra en B.

**Objetivo Específico 1.** Analizar el rol de la enzima *KDM6B* en el desarrollo de un fenotipo de TEA en ratones KO.

**1.1 Analizar cambios de expresión y cambios en las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas asociadas a la pérdida de función de *KDM6B.***

Una vez analizadas las pruebas de comportamiento, realizamos la eustanasia de los animales de estudio y la extracción de los cerebros. El tejido fue dividido y se evaluaron los cambios de expresión de ARNm y proteína, así como también cambios en marcas postraduccionales asociadas a la enzima *KDM6B*. Como fue mencionado anteriormente, el primer paso fue analizar los cambios en la expresión de *KDM6B* para determinar si el KO fue efectivo. En la Tabla 2 se resumen los cambios de expresión a nivel de ARN mensajero de todos los animales *KDM6B* KO utilizados.Para los análisis de comportamiento finales solo se utilizaron aquellos que tuvieran más de un 50% de reducción en la expresión de *KDM6B* y los otros fueron descartados de los análisis, como se ve en la Tabla 2.

Una vez depurados los datos, se realizó un promedio de los animales para determinar la reducción de la expresión promedio de los animales analizados en comportamiento encontrando una reducción de aproximadamente un 70% en los niveles de ARNm (Figura 3).

Para validar los cambios en expresión, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia de cortes coronales de cerebro contra *KDM6B* en la condición control y KO para poder observar la reducción en la expresión de esta proteína. Encontramos que en los animales kdm6b ko existe una reducción significativa en los niveles de expresión de la enzima en los cortes (Figura 4 A-D y E-H). De igual forma se confirmó su localización en el núcleo como era de esperar al tratarse de una enzima remodeladora de la cromatina del tipo borradora específica de H3K27.

Como hemos mencionado anteriormente, la enzima *KDM6B* es una de las encargadas de remover la marca H3K27me3 para llevar a un aumento de la expresión génica. En consecuencia, el KO de la enzima llevaría a un aumento general de esta marca en las células. Para determinar si el KO

de la enzima afecta los niveles globales de la marca H3K27me3, se realizó un western blot utilizando anticuerpos específicos contra esta modificación en las colas de las histonas. Encontramos que en 3 de 4 animales KO analizados, esta marca se ve aumentada. Esto se explica como consecuencia del KO de *KDM6B*, ya que se pierde su actividad demetilasa y se acumula la marca H3K27me3 (Figura 5).

**Tabla 2.** Valores de expresión relativa a GAPDH de animales *KDM6B* KO, expresados como $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, los valores destacados en verde y negrita corresponden a los animales considerados para los análisis de comportamiento.

| Animal | $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ | Animal | $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ |
|---|---|---|---|
| KDM6B KO 1 | **0.18** | KDM6B KO 9 | 0.55 |
| KDM6B KO 2 | 1.41 | KDM6B KO 10 | 0.95 |
| KDM6B KO 3 | **0.19** | KDM6B KO 11 | 0.72 |
| KDM6B KO 4 | **0.23** | KDM6B KO 12 | **0.39** |
| KDM6B KO 5 | 4.76 | KDM6B KO 13 | **0.35** |
| KDM6B KO 6 | **0.39** | KDM6B KO 14 | **0.07** |
| KDM6B KO 7 | **0.47** | KDM6B KO 15 | 0.64 |
| KDM6B KO 8 | 0.62 | KDM6B KO 16 | **0.30** |

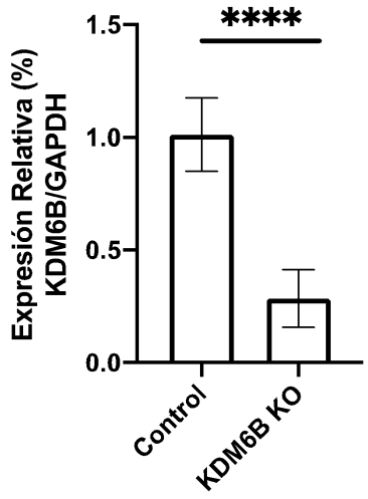



**Figura 3. Expresión relativa de *KDM6B* en corteza de animales.** Se extrajo ARN total desde corteza de animales Control y *KDM6B* KO, se transformó a ADNc y luego se cuantificaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para el ARNm de *KDM6B*. Se utilizó GAPDH como gen normalizador. Al menos 3 experimentos independientes de RT-qPCR se analizaron para cada condición. Los datos representan el promedio ± SEM. T-test **** $p<0.0001$.

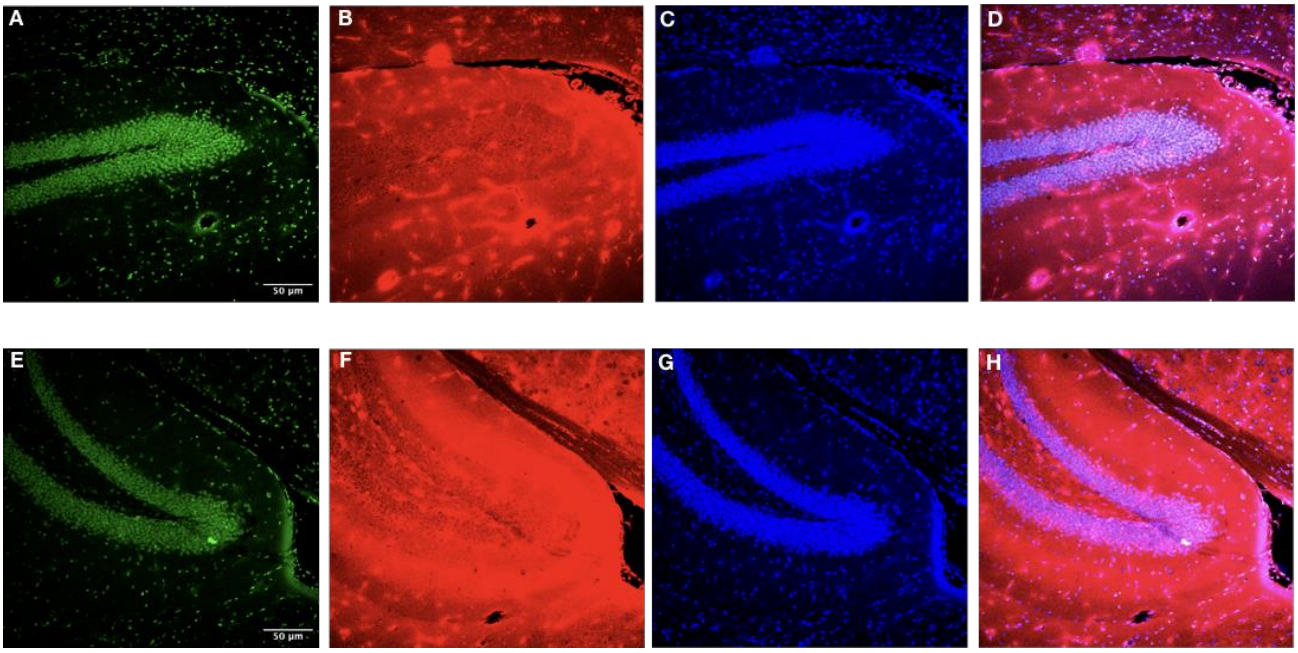



**Figura 4. Inmunofluorescencia representativa de condición control y *KDM6B* KO contra *KDM6B*.P**anel superior corresponde a condición control: **A)** anti-*KDM6B* conjugado con Alexa Fluor 488. **B)** Infección mediada por AAV vacío con tdTomato. **C)** DAPI. **D)** Merge**.** Panel inferior *KDM6B* KO: **E)** anti-*KDM6B* conjugado con Alexa Fluor 488. **F)** Infección mediada por AAV con ARNg contra *KDM6B* con tdTomato. **G)** DAPI. **H)** Merge. Barra de escala 50 µM.

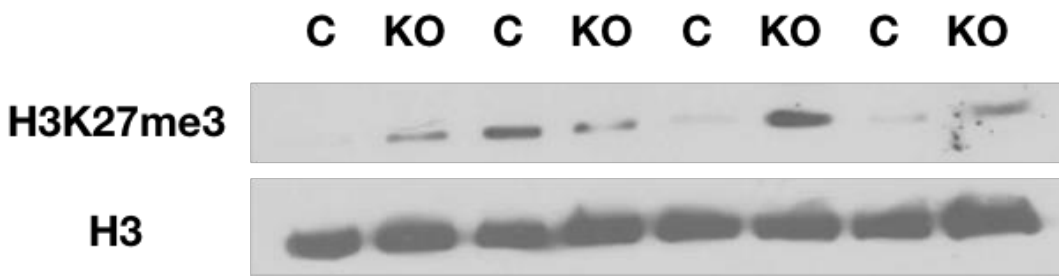



**Figura 5. Western blot representativo de *KDM6B* KO.** Western blot contra la marca represiva H3K27me3 asociada a *KDM6B*. Se cargaron 10 µg de extractos nucleares de 4 controles y 4 animales *KDM6B* KO, la detección de la histona H3 se utilizó como control de carga.

Con el objetivo de verificar si el genoma de los animales *KDM6B* KO fue editado, se llevó a cabo el ensayo Surveyor con 5 muestras Control y 9 KO que disminuyeron la expresión del ARNm de *KDM6B* en más de un 50% como se ve reflejado en la Figura 6. Este ensayo permite determinar si la secuencia de ADN blanco para *KDM6B* con CRISPR/Cas9 sufrió alteraciones en su secuencia de ADN. Encontramos que todos los animales KO presentan bandas de menor peso molecular que no existen en los animales control, indicando que se produjeron cambios en la secuencia de ADN blanco.

Para entender cómo el KO de la enzima *KDM6B* influye en la expresión de otros genes, se llevó a cabo un screening de 6 genes que se han estudiado previamente en el laboratorio para determinar si es que existen alteraciones en la maduración sináptica (Figura 7). Uno de los fenómenos más reconocibles en TEA, es el retraso en la maduración sináptica producida por cientos de mutaciones. Este retraso lleva a que las neuronas y el cerebro completo presenten un estado de inmadurez. Es posible estudiar este estado mediante el análisis de marcadores de madurez e inmadurez sináptica ya descritos anteriormente (Bustos et al., 2014). Como marcadores de neuronas inmaduras se puede determinar la expresión de *DCX* y *NR2B*, y de neuronas maduras la expresión de *PSD95*, *NeuN*, *NR2A* y *KCC2b*. Por lo tanto si los KO están modificando la maduración del circuito neuronal deberíamos ver variación en la expresión de estos genes respecto al control.

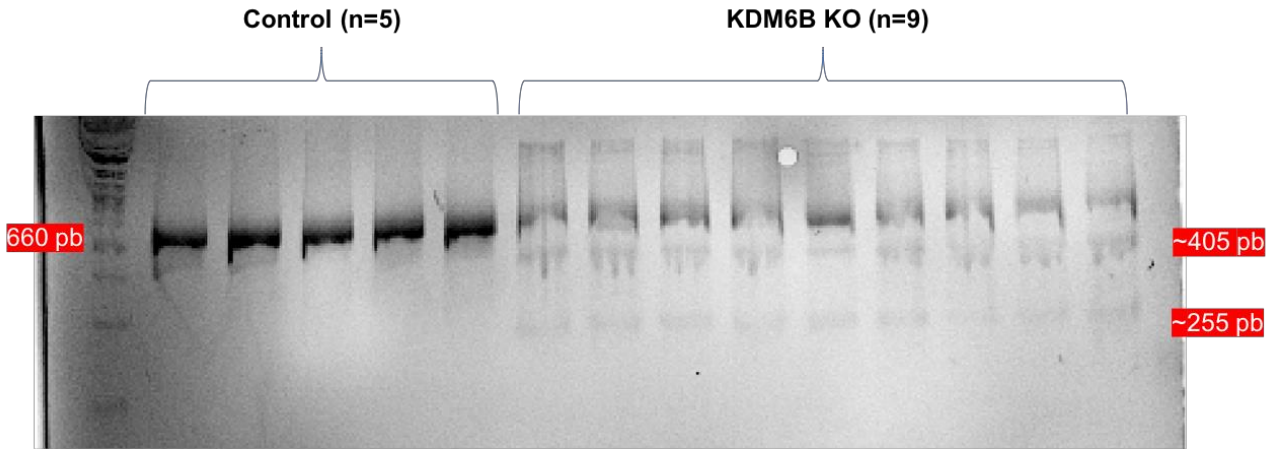



**Figura 6. Edición del genoma en animales *KDM6B* KO.** La presencia de bandas de 660, ~405 y ~255 pb en las muestras de animales *KDM6B* KO indica que la secuencia de ADN fue editada mediante el sistema CRISPR/Cas9, en cambio el ADN control muestra una única banda de 660 pb demostrando así que la secuencia codificante para *KDM6B* no está alterada.

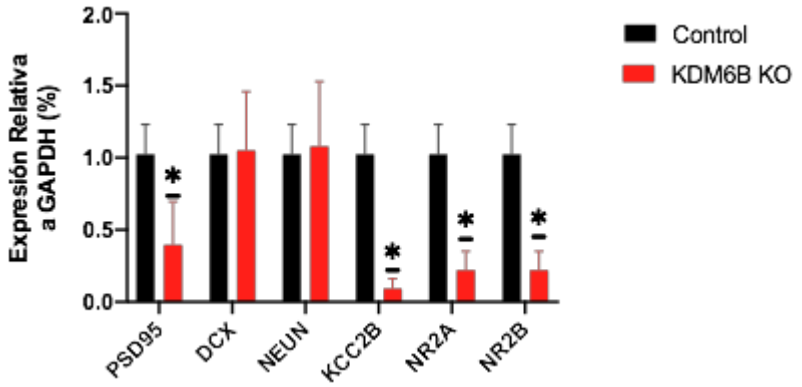



**Figura 7. Cambios de expresión de mRNA asociados al KO de *KDM6B*.** Se extrajo ARN total desde corteza de animales Control y *KDM6B* KO, se transformó a ADNc y luego se cuantificaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para *PSD95*, *DCX*, *NeuN*, *KCC2B*, *NR2A* y *NR2B*. Se utilizó GAPDH como gen normalizador. Al menos 3 experimentos independientes de RT-qPCR se analizaron para cada condición. Los datos representan el promedio ± SEM. Multiple T-test *PSD95* p * 0.009, *KCC2B* p * <0.001, *NR2A* p * < 0.001 y *NR2B* p * < 0.001.

### 1.2 Determinar la aparición de comportamientos tipo TEA en animales *KDM6B* KO.

Se ha observado que en algunos casos de TEA las mutaciones que provocan el fenotipo podrían estar afectando los movimientos motores, movimientos coordinados y motricidad fina de los individuos (Bhat et al., 2011). Por esta razón, quisimos determinar si la movilidad de los animales *KDM6B* KO se veía afectada. Esto basado en que al verse afectada, el resto de los análisis de comportamiento también reflejarán una reducción en la movilidad debido al KO del gen.

Para determinar cambios en la capacidad motora de los animales *KDM6B* KO, comenzamos estudiando las diferencias en su desplazamiento utilizando la prueba de Rotarod. Esta prueba consiste en posar a los animales sobre una varilla giratoria con una velocidad inicial de 4 rpm y velocidad de aceleración 20 rpm/min, y se registra el tiempo promedio que permanecen en ella en 3 intentos. Los animales *KDM6B* KO poseen una capacidad de movimiento significativamente aumentada, ya que encontramos que permanecen un mayor tiempo sobre la varilla giratoria en comparación a la condición control (Figura 8B).

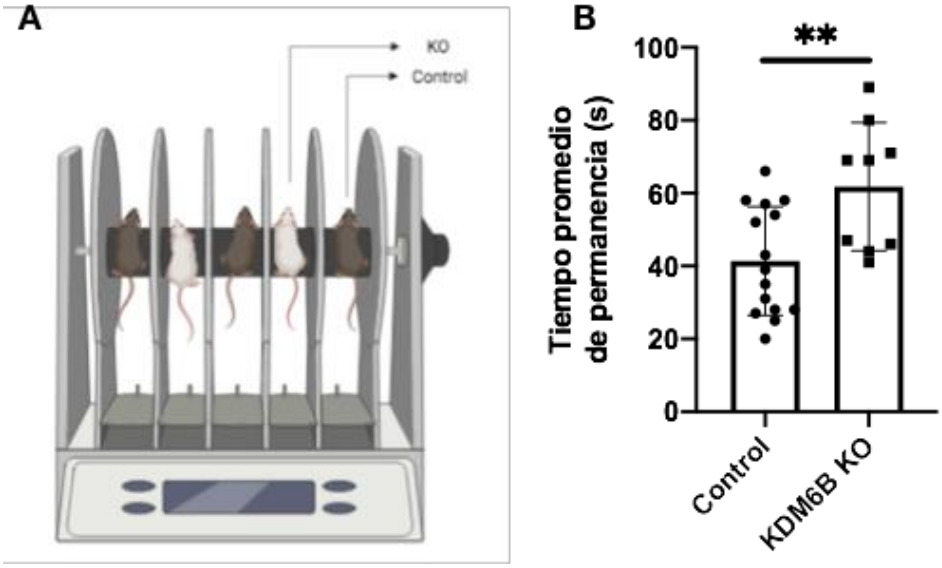



**Figura 8. Tiempo promedio de permanencia en la rueda giratoria de ratones *KDM6B* KO.** Los animales fueron puestos en la varilla giratoria de la prueba Rotarod con velocidad de inicio de 4 rpm y aumento de aceleración de 20 rpm/min durante 3 min máximo. **A)** Esquema representativo del aparato de Rotarod. **B)** Tiempo promedio de permanencia de los animales en el aparato. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KDM6B* KO n = 9. T-test ** p 0.0062.

### 1.2.1 Análisis de ansiedad y comportamientos repetitivos en animales *KDM6B* KO.

La ansiedad es una característica que se presenta normalmente en niños con TEA que se va agravando a medida que pasan a su adolescencia (White et al., 2009). Con esta información presente, estudiamos los comportamientos del tipo ansioso utilizando distintas pruebas que nos permiten cuantificar la ansiedad en los animales. Primero hicimos la prueba de Campo Abierto donde se dejaron a los animales en el centro de una caja y se les permitió explorar libremente durante 10 minutos para así monitorear su trayectoria, tiempo y distancia en centro y periferia (Figura 9 A-B). En esta prueba un mayor tiempo en el centro indica un bajo nivel de ansiedad y mayor tiempo en la periferia se interpreta como ansiedad elevada. Encontramos que la condición *KDM6B* KO tiene una tendencia a permanecer menos tiempo en el centro de la caja en comparación al control (Figura 9C), mientras que el tiempo en la periferia no registró mayores variaciones (Figura 9G). La distancia total recorrida, así como también en periferia y centro no varían de manera significativa entre la condición control y *KDM6B* KO (Figura 9 D, E y F).

Otra prueba que permite evaluar el comportamiento ansioso es a través de la prueba cambios de luz/oscuridad (Figura 10 A y B), que se basa en la aversión innata de los roedores a los lugares iluminados y a su capacidad espontánea de exploración en respuesta a estresores ambientales, en este caso el aparato y la luz (Bourin & Hascoët, 2003). Para la condición *KDM6B* KO no se encontraron diferencias significativas al comparar con la condición control en cuanto a las veces que los animales pasaron a la zona iluminada (Figura 10C), el tiempo que pasaron los animales en la zona iluminada (Figura 10D), ni la distancia que recorrieron en la zona iluminada (Figura 10E).

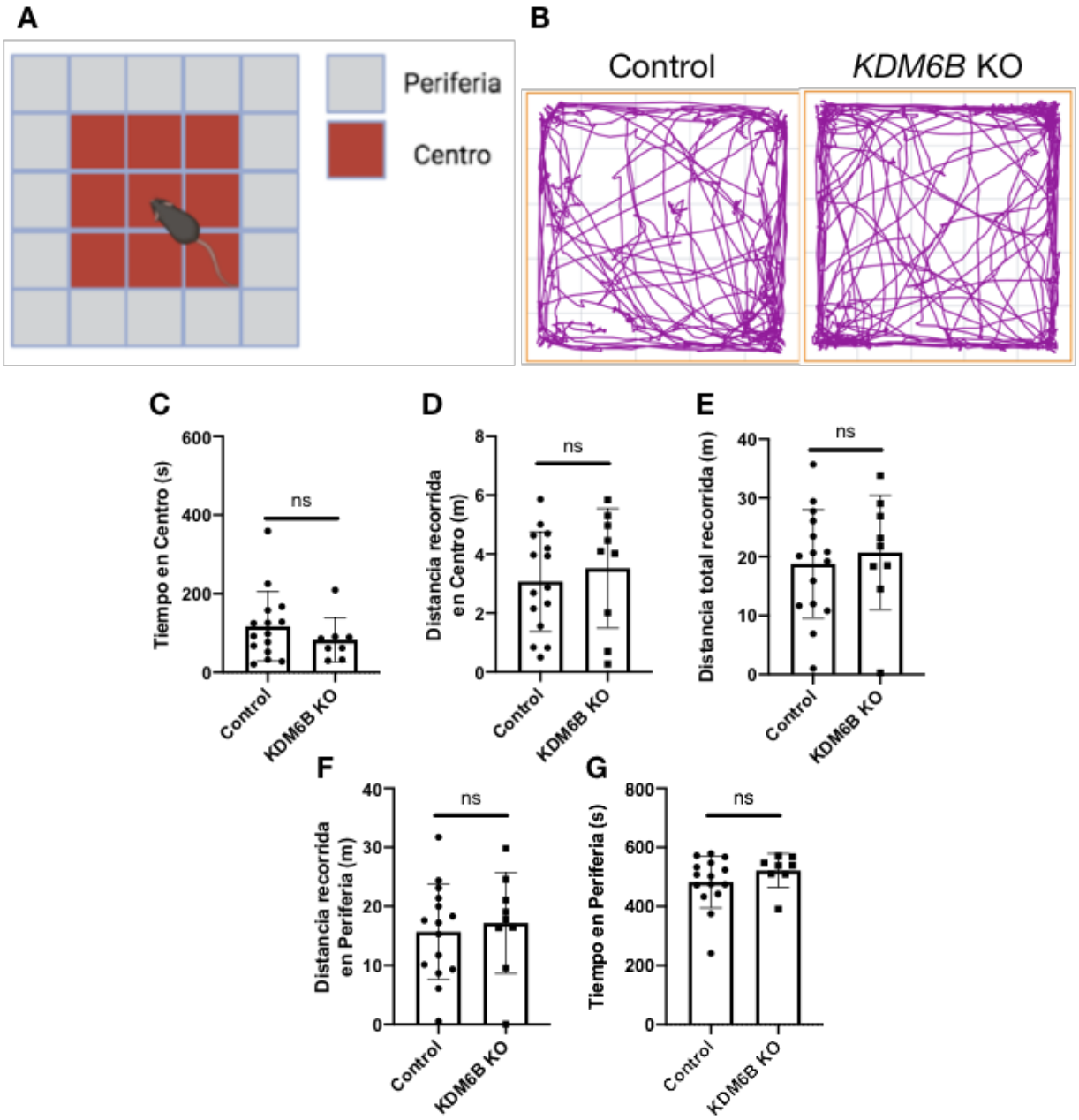



**Figura 9. Prueba de campo abierto en ratones *KDM6B* KO**. Los animales fueron puestos en el centro del campo, grabados por 10 minutos y se monitoreo su comportamiento. **A)** Esquema representativo de la prueba indicando zona central y periferia. **B)** Trayectoria representativa de la condición control y *KDM6B* KO. **C)** Tiempo de permanencia en el centro. **D)** Distancia recorrida en el centro de la prueba. **E)** Distancia total recorrida por los animales. **F)** Distancia recorrida en periferia. **G)** Tiempo de permanencia de los animales en la periferia. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KDM6B* KO n = 9.

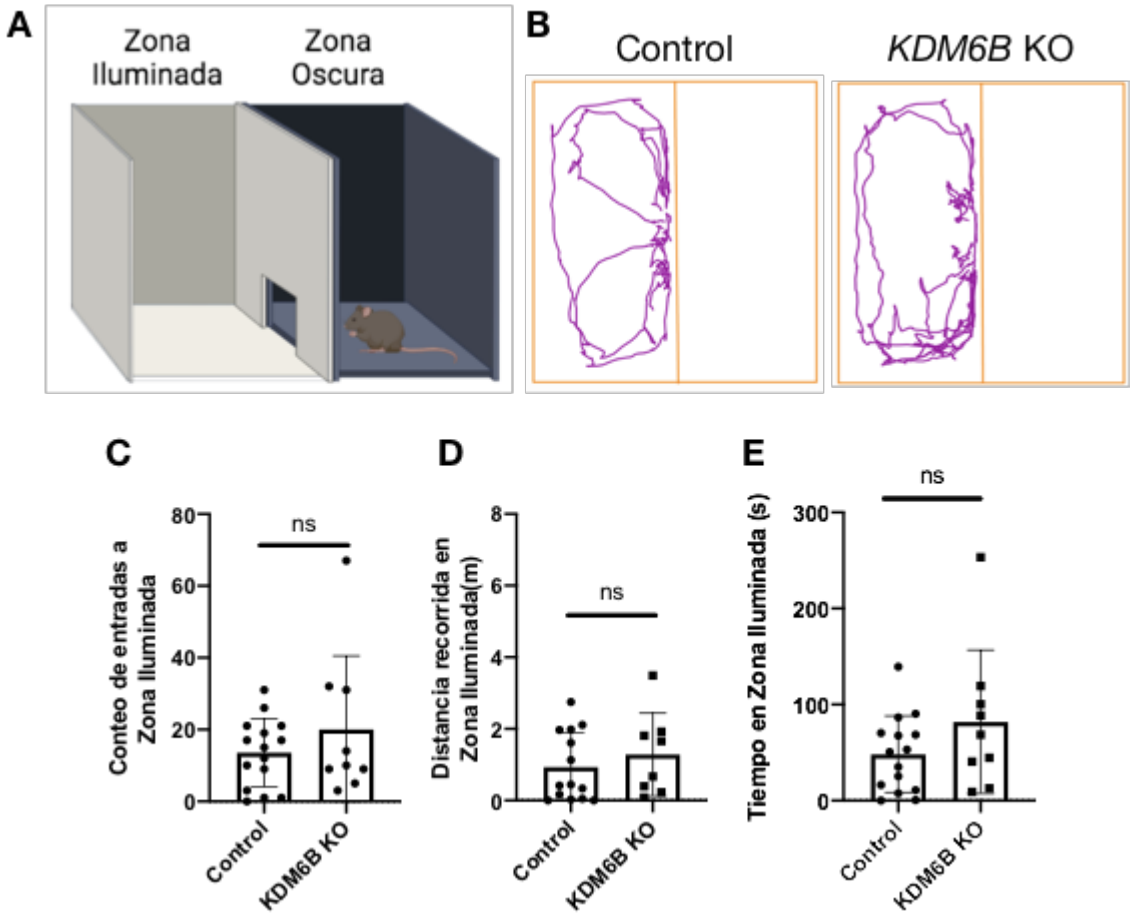



**Figura 10. Prueba de luz y oscuridad en animales *KDM6B* KO.** Animales comenzaron en la zona oscura del aparato, fueron grabados por 10 min y se registró su comportamiento. Animales comenzaron en la zona oscura del aparato, fueron grabados por 10 min y se registró su comportamiento. **A)** Esquema representativo de la prueba. **B)** Trayectorias representativas de condiciones control y *KDM6B* KO. **C)** Número de entradas al compartimiento iluminado. **D)** Distancia recorrida por los animales en la zona iluminada**. E)** Tiempo pasado en el compartimiento iluminado. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KDM6B* KO n = 9.

A continuación evaluamos ansiedad a través de la prueba del Laberinto Cero Elevado (Figura 11A y B). Donde los animales se posan sobre un aparato circular en altura, con 2 secciones abiertas y 2 cerradas donde son monitoreados por 10 min. En esta prueba pudimos encontrar que el tiempo que los animales *KDM6B* KO pasan en la zona abierta es significativamente mayor al comparar con el control (Figura 11C). En cuanto a la distancia recorrida en la zona abierta no existen diferencias significativas (Figura 11D). También registramos las veces que los animales entran a la zona abierta, donde pudimos observar que existe un aumento significativo de las entradas en la condición *KDM6B* KO (Figura 11E), lo que podría interpretarse como que dicha condición posee menor ansiedad y/o miedo a las alturas. Para el tiempo en la zona cerrada, distancia en zona cerrada y distancia total recorrida no observamos diferencias significativas (Figuras 11 F, G y H).

Finalmente, para determinar la presencia de comportamientos del tipo ansioso y además si los animales KO presentan uno de los rasgos distintivos del TEA como son los comportamientos repetitivos, utilizamos la prueba *Marble Burying* o Enterramiento de Canicas (Figura 12A). En esta prueba, dentro de una caja rellena con viruta de madera se posan 49 bolitas en un patrón de 7x7 y se monitorea cuantas bolitas son enterradas por los animales en 30 min. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de canicas enterradas (Figura 12B), pero sí una tendencia a que la condición *KDM6B* KO entierra mayor número de bolitas que la condición control. Esta información podría ser significativa aumentando el número de individuos de la condición *KDM6B* KO.

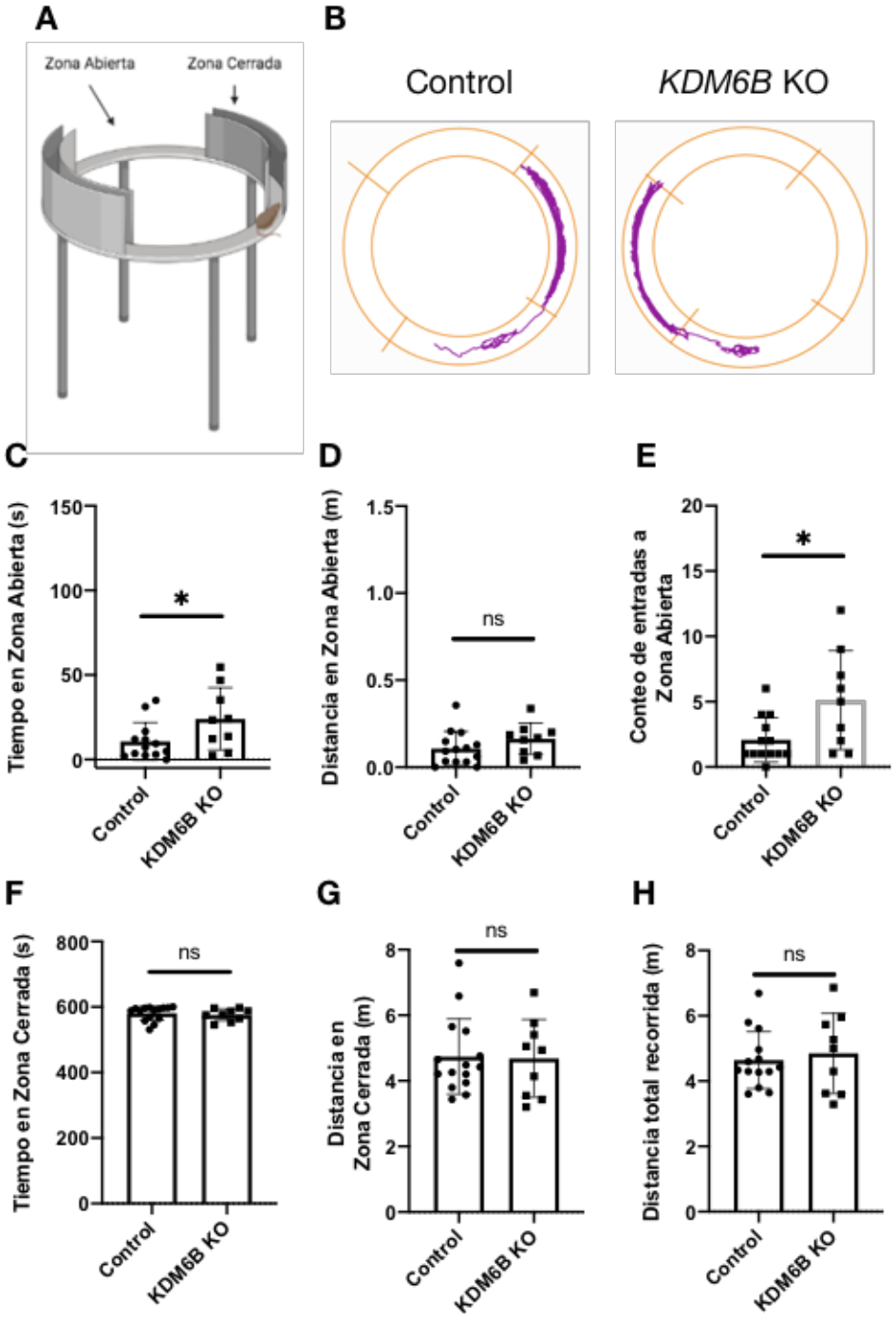



**Figura 11. Prueba del laberinto cero elevado en ratones *KDM6B* KO**. Los animales fueron puestos en un sector cerrado y grabados por 10 min para registrar comportamiento. **A)** Esquema representativo del aparato, donde se indica el sector cerrado y abierto. **B)** Trayectorias representativas de la condición control y *KDM6B* KO. **C)** Tiempo que estuvieron los animales en la zona abierta. **D)** Distancia recorrida en zona abierta. **E**) Número de entradas a la zona expuesta. **F)** Tiempo en el sector cerrado. **G)** Distancia recorrida en el sector cerrado. **H)** Distancia total recorrida durante los 10 min de prueba. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15, *KDM6B* KO n = 9. T-test A * p 0.0465 y C * p 0.0188.

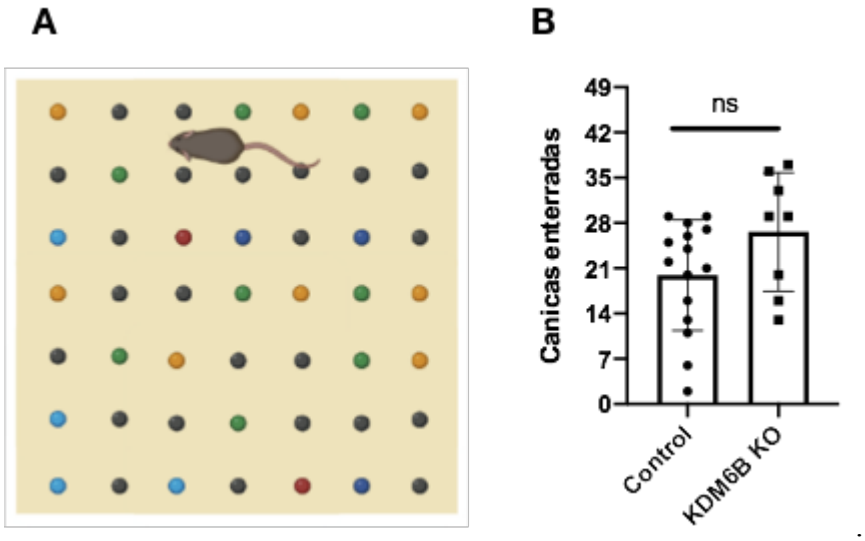



**Figura 12. Prueba de enterramiento de canicas en animales *KDM6B* KO.** Los animales fueron puestos en un campo abierto cubierto con viruta de madera y con canicas repartidas uniformemente. **A)** Esquema representativo de la prueba. **B)** El gráfico de barras muestra el número de canicas enterradas hasta ⅔ en 30 min de prueba. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15, *KDM6B* KO n = 9.

### 1.2.2 Comportamientos asociados a la capacidad social de la condición *KDM6B* KO.

La capacidad de socializar es un comportamiento que está estrechamente relacionado al TEA. Para determinar cambios en sociabilización de los animales, utilizamos la prueba de las Tres Cámaras (Figura 13A), en donde existen dos estímulos: uno social que es un animal WT del mismo sexo y edad similar del animal testeado, y otro estímulo no social que corresponde a un objeto inanimado. En esta prueba no encontramos una diferencia significativa en el número de veces que los ratones de condición *KDM6B* KO interactúan con el animal y tampoco en el tiempo que permanecen en la zona animal así como también en el tiempo de interacción con el animal encerrado en la jaula en comparación con el control (Figura 13 B, C y D). Al medir los mismos parámetros pero en la zona objeto encontramos que no existen diferencias significativas al comparar con el control (Figura 13 E, F y G). En conjunto, esto podría interpretarse como que el animal no presenta incapacidad social.

Otra forma de monitorear la sociabilización, es con el Test de Interacciones Sociales, en el cual se llevó a cabo depositando animales Control o *KDM6B* KO en una caja en total oscuridad para que interaccionara con un animal WT del mismo sexo y edad similar. Donde se pudo registrar que las interacciones Nariz-Nariz y Nariz-Cara no tienen diferencias significativas al comparar la condición *KDM6B* KO con la control (Figura 14 A y B). Por otro lado, la interacción Nariz-Zona Anogenital presenta una disminución significativa en la condición *KDM6B* KO (Figura 14C), lo que se puede interpretar como que los animales no tienen interés en la reproducción ni en socializar con animales desconocidos (Crawley, 2007). En cuanto a la cantidad de veces que los animales *KDM6B* KO se acicalan, existe un aumento significativo al comparar con la condición control, reflejando así un tipo de comportamiento repetitivo (Figura 14D). Finalmente, en los eventos agresivos como acicalamiento agresivo o agresión por olfateo reiterados no se observan diferencias significativas entre la condición control frente a *KDM6B* KO (Figura 14E).

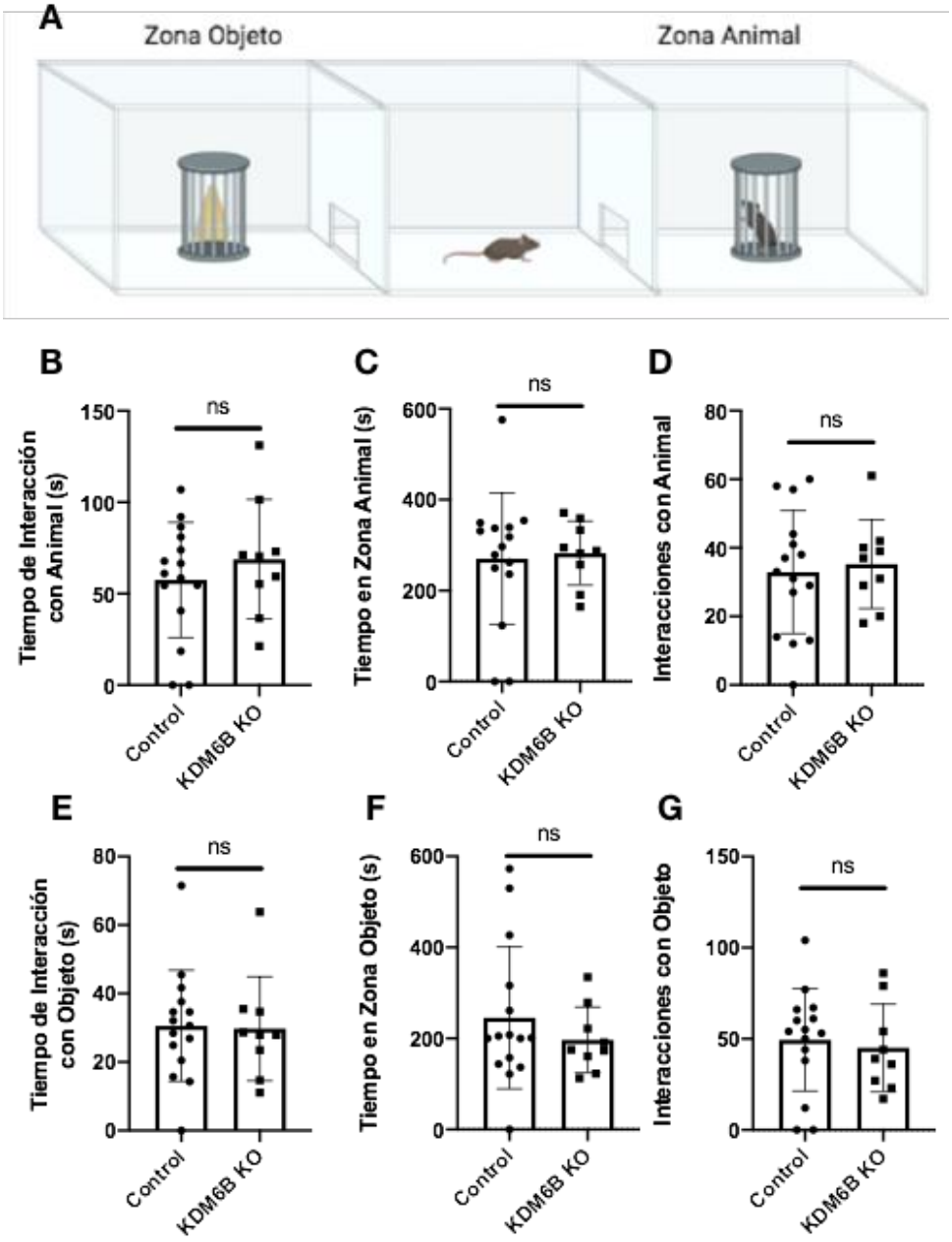



**Figura 13. Prueba de las tres cámaras en ratones *KDM6B* KO.** Los animales se dejaron en el centro del aparato de tres cámaras, se grabó por 10 min y se registró su comportamiento. **A)** Representación de la prueba de 3 cámaras y sus respectivas zonas. **B)** Tiempo de interacción con el animal encerrado. **C)** Tiempo en la zona social o con el animal encerrado **D)** Conteo de interacciones del ratón testeado con el animal encerrado. **E)** Tiempo de interacción con el objeto o estímulo no social. **F)** Tiempo en la zona de exploración del objeto. **G)** Conteo de interacciones con el objeto. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KDM6B* KO n = 9.

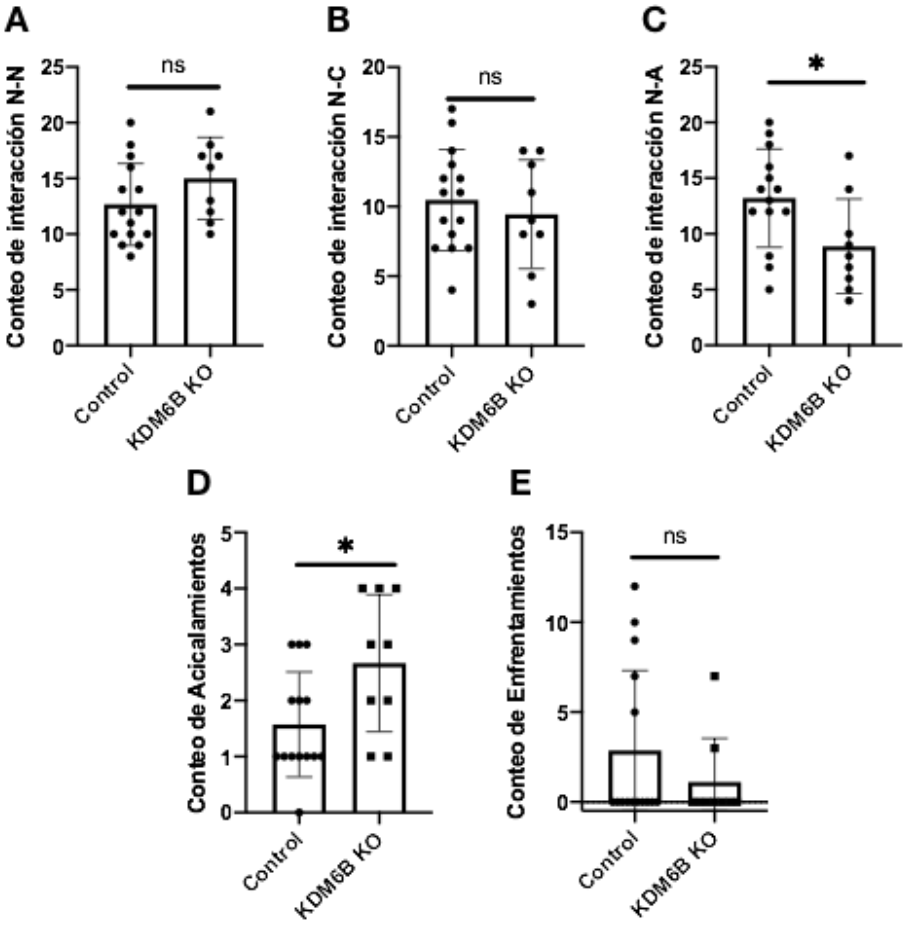



**Figura 14. Prueba de interacciones sociales en animales *KDM6B* KO.** Los animales fueron puestos en una caja oscura durante 10 min para monitorear las interacciones con un ratón desconocido WT del mismo sexo y edad similar. **A)** Conteo de interacciones Nariz-Nariz. **B)** Conteo de interacciones Nariz-Cara. **C)** Conteo de interacciones Nariz-Zona Anogenital. **D)** Conteo de eventos de acicalamientos de los animales. **E)** Conteo eventos de agresividad desde el animal estudiado hacia el ratón WT. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KDM6B* KO n = 9. T-test C * p 0.0300 y D * p 0.0243.

Para determinar si los animales KO son más agresivos o dominantes frente a los animales controles, se realizó la prueba de Dominancia del Tubo (Figura 15A). En la cual se realizaron enfrentamientos de animales del mismo sexo del tipo Control-*KDM6B* KO durante 4 días, previo a un entrenamiento y habituación con los tubos. Los resultados indican que en promedio, la condición *KDM6B* KO gana un 62.1% de los enfrentamientos distribuidos en los 4 días de prueba (Figura 15B). Estableciendo así, que los ratones de condición *KDM6B* KO son más dominantes frente a la condición control, ya que permanecen en el tubo durante más enfrentamientos estableciendo así el aparato como un lugar seguro en 3 de 4 días.

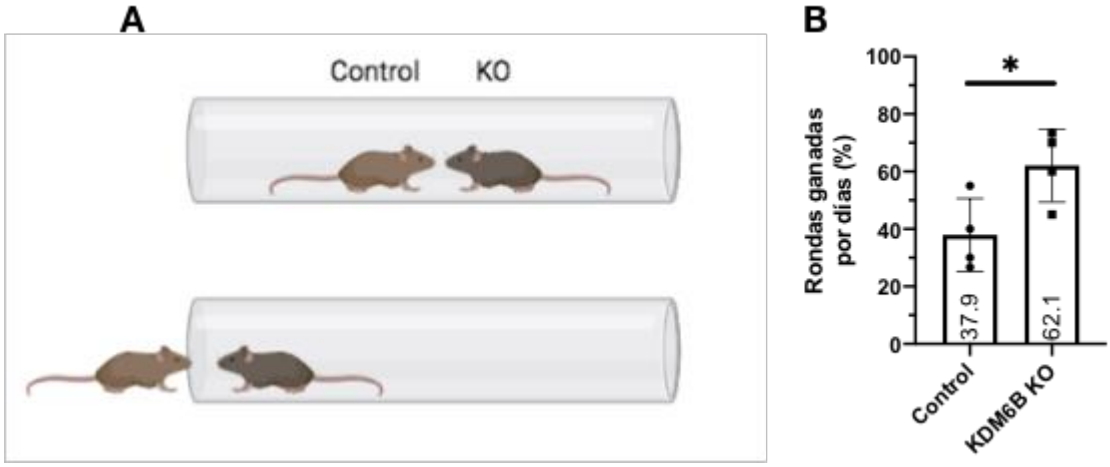



**Figura 15. Prueba de la dominancia del tubo en ratones *KDM6B* KO.** Los animales se entrenaron para entrar al tubo por 5 días, del día 6 al 9 se enfrentaron 3 veces por día a individuos control y *KDM6B* KO aleatoriamente por sexo y se registraron las veces que ganó/perdió cada animal. **A)** Esquema representativo del comienzo y final de la prueba. **B)** En la figura se muestra el promedio de victorias de los 27 enfrentamientos realizados por día. Cada círculo o cuadrado corresponde al porcentaje de victorias de los días 6, 7, 8 y 9 de la condición control y *KDM6B* KO, respectivamente. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15, y *KDM6B* KO n = 9. T-test * p 0.0362.

### 1.2.3 Evaluación de memoria en animales *KDM6B* KO.

Un rasgo que se ve alterado en algunos individuos con TEA es la capacidad de formar memoria, aprendizaje y razonamiento espacial (Banker et al., 2021). Para evaluar esto utilizamos dos test condicionamiento al miedo y laberinto de Barnes, que nos permiten evaluar este aspecto de comportamiento.

En la prueba *Fear Conditioning* o Condicionamiento al Miedo (Figura 16A), los animales primero son habituados en una caja, al día siguiente se entrenan en la misma caja y se emite un sonido (3000 Hz, 85 db), finalizado el sonido se aplica un impulso/*shock* eléctrico. Con el objetivo de medir la formación de memoria a largo plazo, el día de prueba (24 horas después del entrenamiento), se cambia la caja y se emite el sonido durante 2 min 30 s para medir el tiempo y eventos de *freezing* de los animales. De esta forma encontramos que la condición *KDM6B* KO no presenta diferencias significativas frente a la condición control (Figura 16 B y C). Sugiriendo así que los animales *KDM6B* KO no tienen alteraciones en su memoria a largo plazo asociada a la amígdala e hipocampo debido al aprendizaje por condicionamiento con estímulos como sonido, *shock* eléctrico y contexto, como las distintas cajas utilizadas reflejados en el *freezing* de los animales durante el tono (Schafe et al., 2001; Sanders et al., 2003).

Finalmente, como parte de las pruebas para evaluar memoria, se realizó el Test del Laberinto de Barnes (Figura 17A). Donde se busca registrar lo que ocurre con el aprendizaje y memoria espacial a través de 3 símbolos que pueden ser reconocidos por el color y forma que están ubicados alrededor del aparato que contiene un agujero de salida y 19 agujeros falsos. Esta prueba involucra memoria y aprendizaje espacial que está asociado al hipocampo, además de la evaluación de la flexibilidad cognitiva asociada a la corteza frontal (Gawel et al., 2018). Luego del primer día de entrenamiento, los animales tendrán 3 min entre los días 2 y 4 para encontrar el agujero de salida. Al quinto día se cambiará la caja de escape y se las dará 1 min 30 s. No se encontraron diferencias significativas al

comparar la condición *KDM6B* KO contra el control en los parámetros medidos como: latencia primaria y total, distancia total, longitud del recorrido primario y tiempo en zona de interés como se puede apreciar en la Figura 17 B-F. Lo que sugiere que esta condición no tiene problemas en la memoria espacial o aprendizaje.

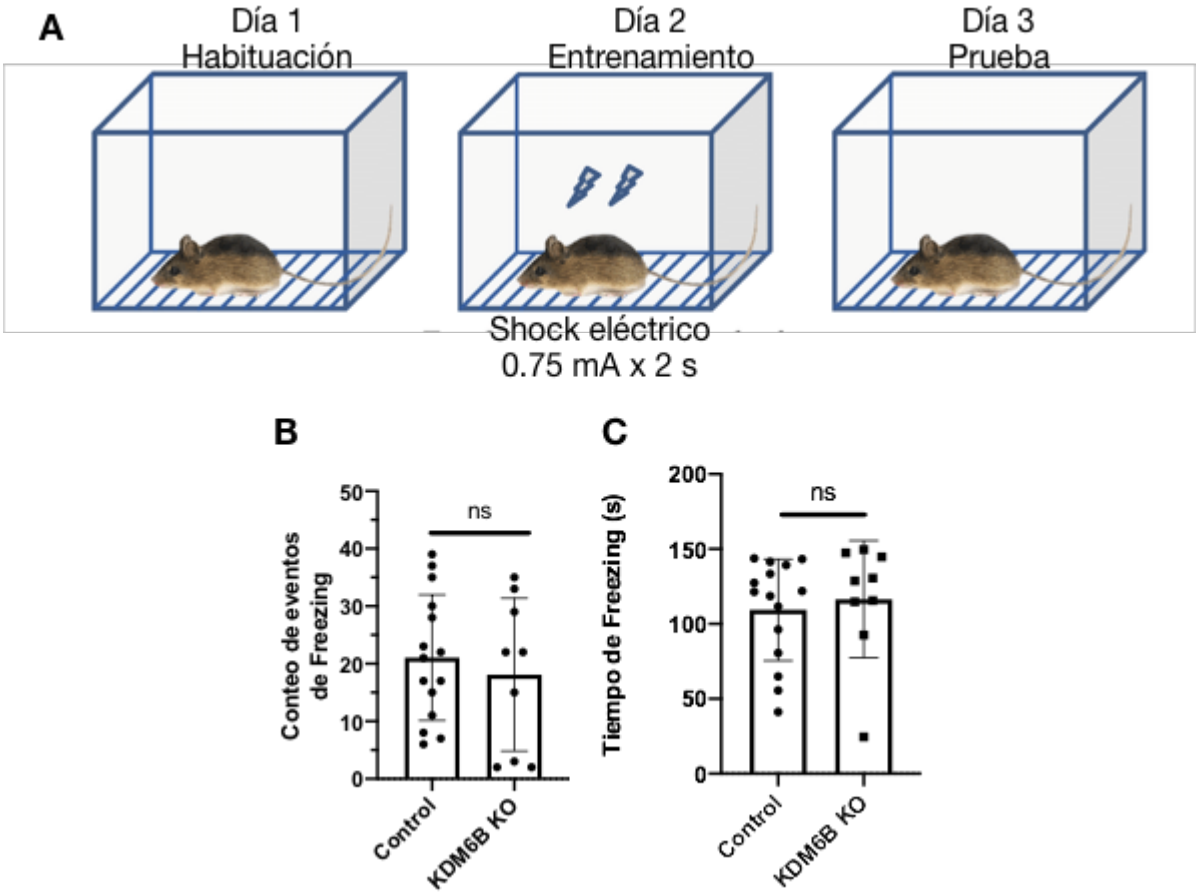



**Figura 16**. **Prueba de condicionamiento al miedo en animales *KDM6B* KO. A)** Esquema representativo de la prueba de comportamiento. En el primer día se habituaron en una caja y, en el segundo, utilizando el mismo aparato se sometieron a un sonido de 3000 Hz a 85 db por 2.5 min. y shock eléctrico de 0.75 mA por 2 segundos. Al tercer día se realizó la prueba, cambiando la caja y emitiendo el sonido sin shock eléctrico para obtener: **B)** Conteo de eventos de freezing de los animales durante la reproducción del sonido. **C)** Tiempo de *freezing* por cada animal durante la reproducción del sonido. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KDM6B* KO n = 9.

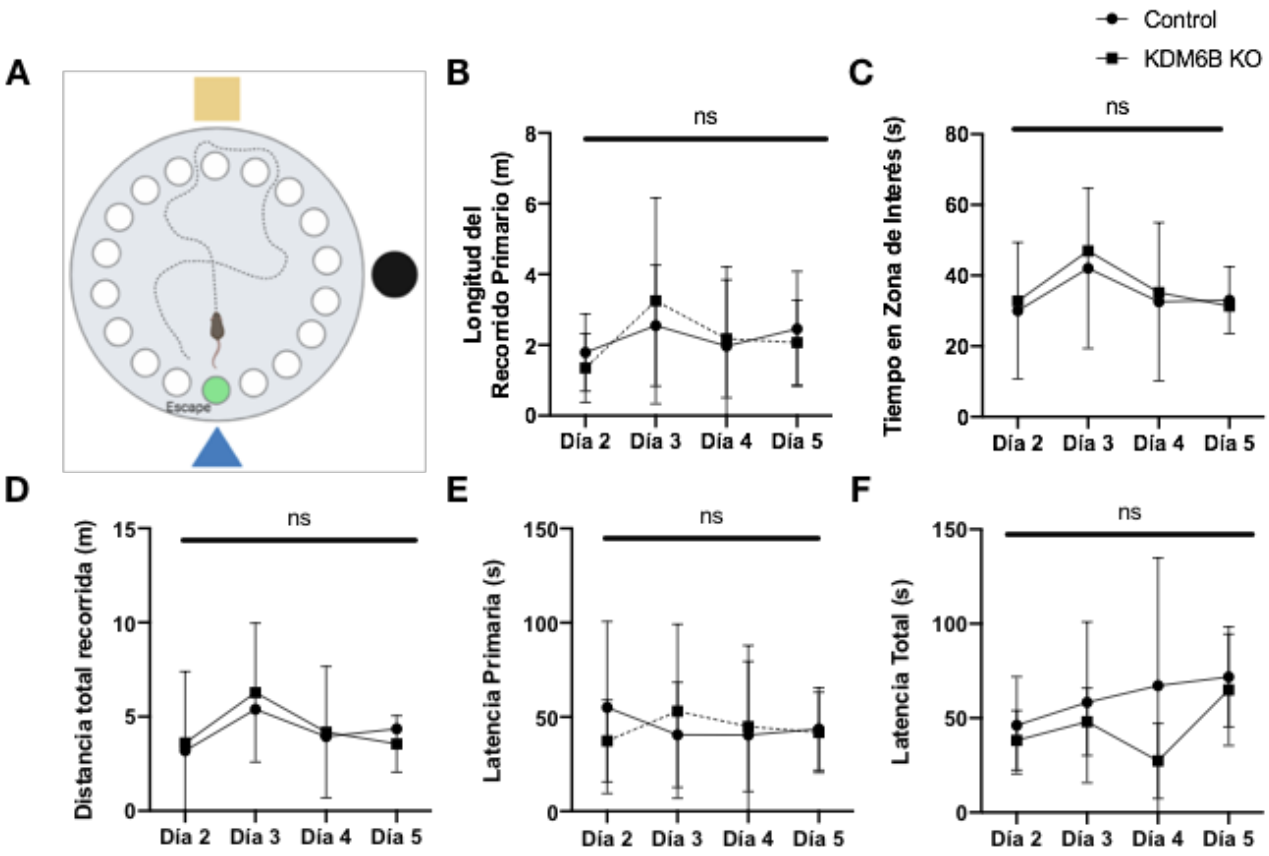



**Figura 17. Prueba de Laberinto de Barnes en ratones *KDM6B* KO.** Los animales entrenaron para entrar a la caja de escape mediante señales visuales por 4 días y se registró su comportamiento. El día 5 se cambió el lugar de escape, se grabó y se registró su comportamiento. **A)** Esquema representativo de la prueba. **B)** Longitud del recorrido primario de los animales del día 2 al 5. **C)** Tiempo pasado por los animales en la zona de interés, cerca de la caja de escape. **D)** Distancia total recorrida durante la duración de la prueba. **E)** Latencia primaria de los animales. **F)** Latencia total registrada de los días 2 al 5. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9.

**Objetivo específico 2.** Analizar el rol de la enzima *KMT2C* en el desarrollo de un fenotipo de TEA en ratones KO.

**2.1 Analizar cambios de expresión y cambios en las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas asociadas a la pérdida de función de *KMT2C.***

Una vez realizadas las pruebas de comportamiento, llevamos a cabo la eustanasia de los animales de estudio y la extracción de los cerebros, que se dividieron en corteza e hipocampo. Se utilizó el mismo criterio que para la condición *KDM6B* KO, por lo que se descartaron para los análisis a aquellos animales con un $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ mayor a 50% como se ve en la Tabla 3. Los cambios en la expresión del ARNm de la condición *KMT2C* KO se pueden observar de manera gráfica en la Figura 18.

De manera análoga a la condición *KDM6B* KO, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia de cortes coronales de cerebro contra *KMT2C* en la condición control y KO para poder observar los cambios de expresión de esta proteína. Encontramos que en los animales KO se aprecia una reducción significativa en la expresión de *KMT2C* en los cortes de tejido (Figura 19 A-D y E-H), De igual forma se confirmó su localización en el núcleo como era de esperar al tratarse de una enzima remodeladora de la cromatina del tipo escritora específica de H3K4me1,3.

Como se mencionó anteriormente, la enzima *KMT2C* es una de las encargada de escribir la marca K4me1 y K4me3 en las colas de la histona H3. Para determinar si el KO de esta enzima produce cambios a nivel global en la marcas H3K4me1 y H3K4me3, se realizaron western blots contra estas marcas. Encontramos que como consecuencia del KO, algunos animales presentan esta disminución en las marcas asociadas , mientras que otros presentan niveles similares a los animales control. (Figura 20 A y B).

**Tabla 3.** Valores de expresión relativa a GAPDH de animales *KMT2C* KO, expresados como $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, los valores destacados en naranjo y negrita corresponden a los animales considerados para los análisis de comportamiento.

| Animal | $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ | Animal | $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ |
|---|---|---|---|
| KMT2C KO 1 | **0.48** | KMT2C KO 9 | 1.77 |
| KMT2C KO 2 | **0.42** | KMT2C KO 10 | 1.69 |
| KMT2C KO 3 | 0.58 | KMT2C KO 11 | **0.45** |
| KMT2C KO 4 | 0.97 | KMT2C KO 12 | 0.84 |
| KMT2C KO 5 | 1.52 | KMT2C KO 13 | **0.39** |
| KMT2C KO 6 | **0.39** | KMT2C KO 14 | **0.47** |
| KMT2C KO 7 | **0.41** | KMT2C KO 15 | **0.38** |
| KMT2C KO 8 | **0.35** | | |

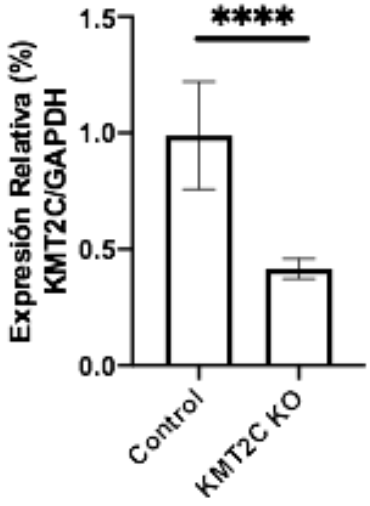



**Figura 18. Expresión relativa de *KMT2C* en animales.** Se extrajo ARN total desde corteza de animales Control y *KMT2C* KO, se transformó a ADNc y luego se cuantificaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para el ARNm de *KMT2C*. Se utilizó GAPDH como gen normalizador. Al menos 3 experimentos independientes de RT-qPCR se analizaron para cada condición. Los datos representan el promedio ± SEM. T-test **** $p<0.0001$.

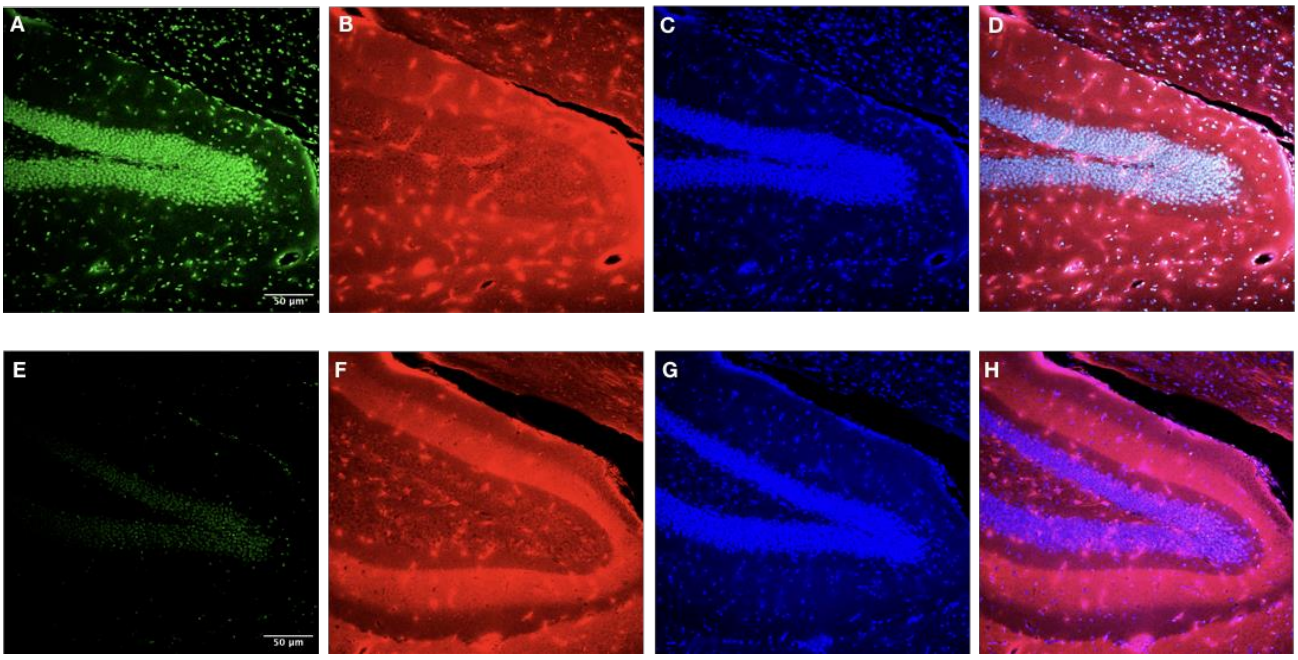



**Figura 19. Inmunofluorescencia representativas de condición control y *KMT2C* KO contra *KMT2C*.** Panel superior corresponde a condición control: **A)** anti-*KMT2C* conjugado con Alexa Fluor 488. **B)** Infección mediada por AAV vacío con tdTomato. **C)** DAPI. **D)** Merge**.** Panel inferior *KMT2C* KO. **E)** anti-*KMT2C* conjugado con Alexa Fluor 488. **F)** Infección mediada por AAV con ARNg contra *KMT2C* con tdTomato. **G)** DAPI. **H)** Merge. Barra de escala 50 µM.

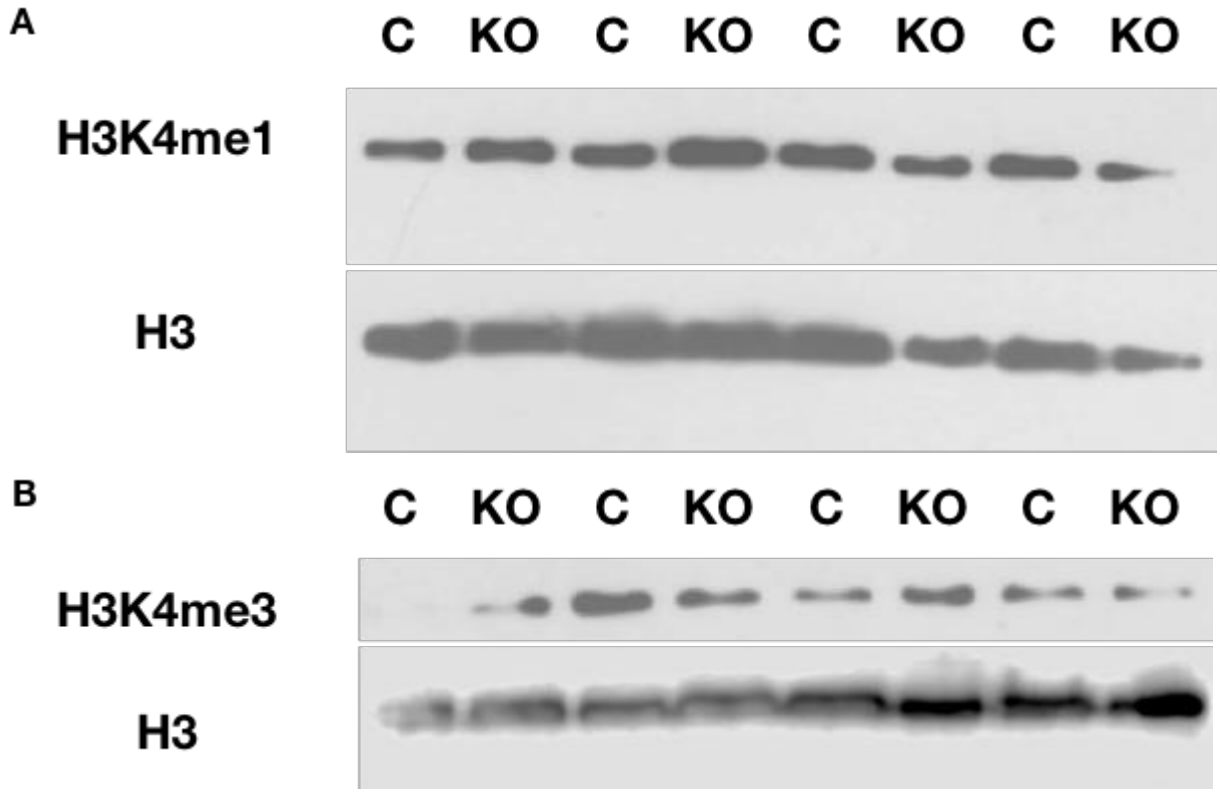



**Figura 20. Western blots representativos de *KMT2C* KO. A)** y **B)** Western blots contra las marcas activadoras H3K4me1 y H3K4me3 asociadas a *KMT2C*. Se cargaron 10 µg de extractos nucleares de 4 controles y 4 animales *KDM6B* KO, con H3 como control de carga.

Nuestros resultados en cultivo han demostrado que posterior al KO de KMT2C, la enzima *KMT2D* es capaz de aumentar su expresión y de cierta forma compensar la pérdida de función de *KMT2C* (Brauer, 2022) Para determinar si es que existe un tipo de compensación por parte de la enzima *KMT2D* debido al KO de *KMT2C*, se realizó un ensayo de RT-qPCR para medir los niveles de ARNm en los animales *KMT2C*. Se observó una leve disminución en la expresión de *KMT2D* al comparar contra la condición control, como se representa en la Figura 21.

Con el objetivo de verificar si el genoma de los animales *KMT2C* KO fue editado, se llevó a cabo el ensayo Surveyor con 5 muestras Control y 9 KO que disminuyeron la expresión del ARNm de *KMT2C* en más de un 50% como se ve reflejado en la Figura 22. Este ensayo permitió determinar si la secuencia de ADN blanco para *KMT2C* con CRISPR/Cas9 sufrió modificaciones en su secuencia genómica. Encontramos que todos los animales KO presentan bandas de menor peso molecular que no existen en los animales control, indicando que se produjeron cambios en la secuencia de ADN blanco.

De manera análoga a la condición *KDM6B* KO, como una aproximación para descubrir cómo el KO de la enzima *KMT2C* influye en la expresión de otros genes, se llevó a cabo el *screening* de 6 genes que sirven como marcadores de neuronas inmaduras como *DCX* y *NR2B,* y de neuronas maduras: *PSD95, NeuN, NR2A y KCC2b.* En el caso de *KMT2C* KO encontramos que sólo *KCC2b* presenta una reducción de expresión respecto al control (Figura 23). Este canal de potasio se ha relacionado directamente a TEA y se ha demostrado que una baja de su expresión lleva a déficit sináptico y cognitivos (Smalley et al., 2020).

En conjunto estos resultados demuestran que el KO es efectivo, ya que baja la expresión del ARNm de *KMT2C*, el ADN se editó y se corroboró por Surveyor, y al menos un gen, *Kcc2b,* baja su expresión cuando *KMT2C* se encuentra KO.

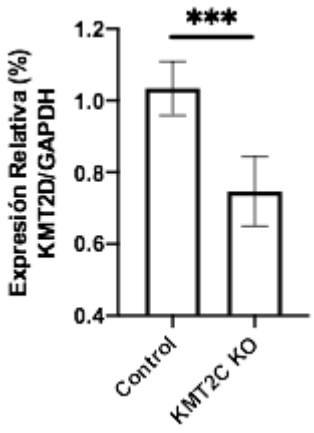



**Figura 21. Cambio de expresión en mRNA de *KMT2D* en animales *KMT2C* KO.** Se extrajo ARN total desde corteza de animales Control y *KMT2C* KO, se transformó a ADNc y luego se cuantificaron los niveles de ARNm de *KMT2D* por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos. Se utilizó GAPDH como gen normalizador. Al menos 3 experimentos independientes de RT-qPCR se analizaron para cada condición. Los datos representan el promedio ± SEM. T-test p *** 0.0009.

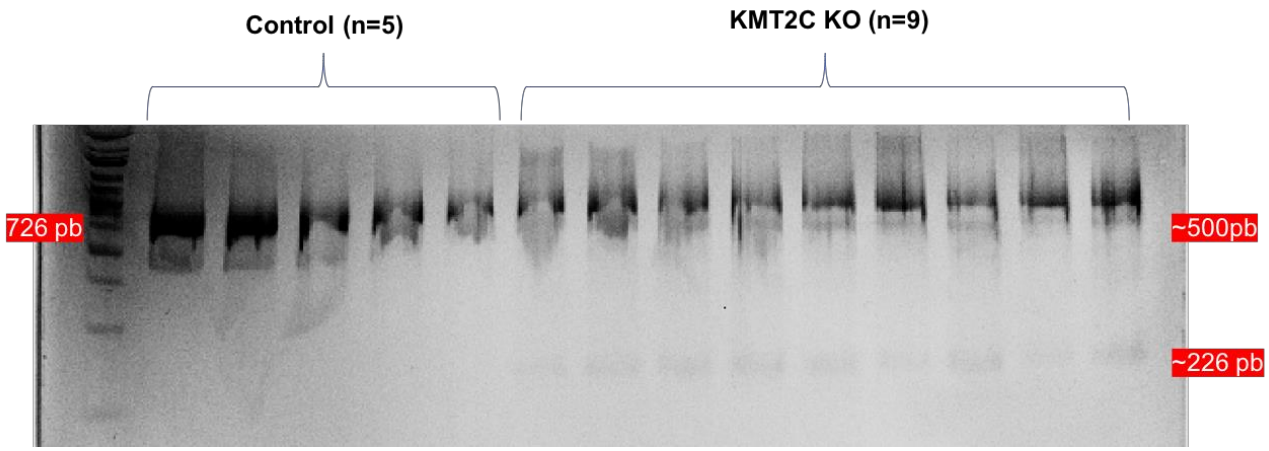



**Figura 22. Edición del genoma en animales *KMT2C* KO.** La presencia bandas de 726, ~500 y ~226 pb en las muestras de animales *KMT2C* KO indica que la secuencia de ADN fue editada mediante el sistema CRISPR/Cas9, en cambio el ADN control muestra una única banda de 726 pb demostrando así que la secuencia codificante para *KMT2C* no está alterada.

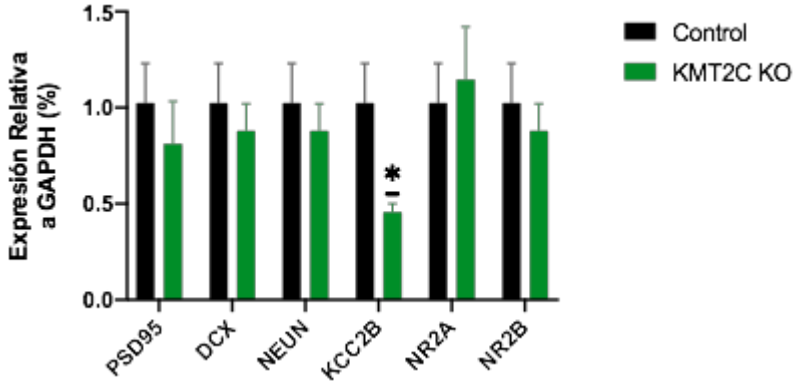



**Figura 23. Cambios de expresión de mRNA asociados al KO de *KMT2C*.** Se extrajo ARN total desde corteza de animales Control y *KMT2C* KO, se transformó a ADNc y luego se cuantificaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para *PSD95*, *DCX*, *NeuN*, *KCC2B*, *NR2A* y *NR2B*. Se utilizó GAPDH como gen normalizador. Al menos 3 experimentos independientes de RT-qPCR se analizaron para cada condición. Los datos representan el promedio ± SEM. Multiple T-test, *KCC2B* p * <0.001.

**2.2. Determinar la aparición de comportamientos tipo TEA en animales *KMT2C* KO.**

Transcurridas las 8 semanas post inyección con AAV codificante para ARNg dirigido contra *KMT2C* se comenzó con las pruebas de comportamiento. Como prueba inicial para evaluar si es que existe algún tipo de alteración en el equilibrio y coordinación motriz que afecte el normal desplazamiento de los animales de condición *KMT2C* KO se realizó el test de la varilla giratoria.

Para determinar si existían diferencias en su desplazamiento se utilizó la prueba de Rotarod, que consiste en posar a los animales sobre una varilla giratoria con una velocidad inicial de 4 rpm y velocidad de aceleración 20 rpm/min, para luego registrar el tiempo promedio que permanecen en ella en 3 oportunidades. Aquí pudimos observar que el desplazamiento de los animales *KMT2C* KO es similar a la condición control al no presentar diferencias significativas en el tiempo promedio de permanencia en el aparato durante las 3 rondas (Figura 24B). Por lo que no existen problemas motrices asociados a la pérdida de función de *KMT2C*.

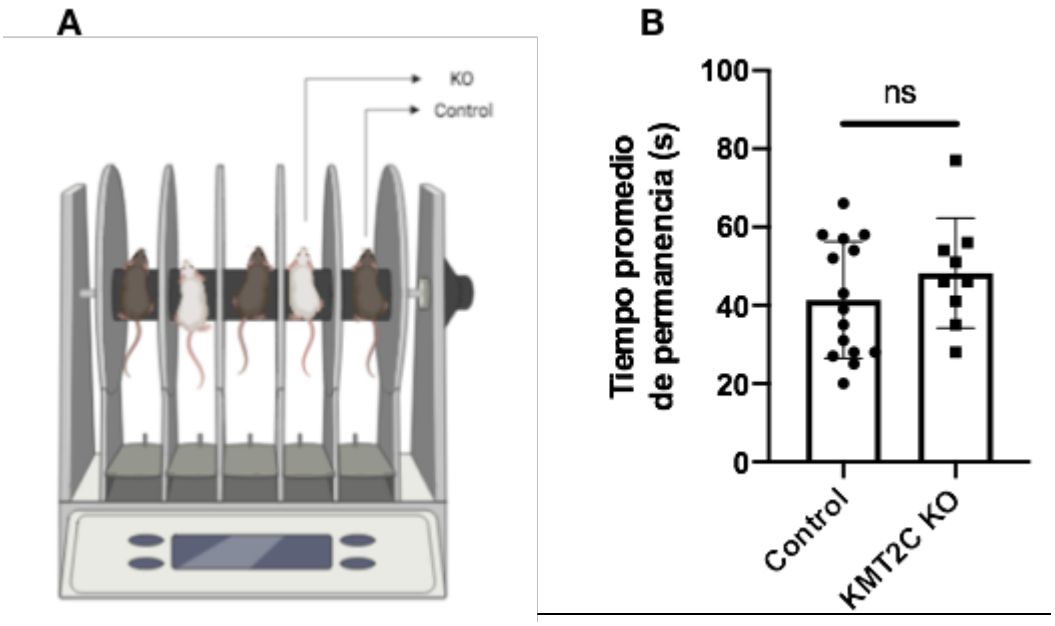



**Figura 24. Tiempo promedio de permanencia en la rueda giratoria de ratones *KMT2C* KO. A)** Los animales fueron puestos en la varilla giratoria de la prueba Rotarod con velocidad de inicio de 4 rpm y aumento de aceleración de 20 rpm/min durante 3 min máximo. **B)** Tiempo de permanencia promedio de las 3 rondas de prueba. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9.

### 2.2.1 Análisis de ansiedad y comportamientos repetitivos en animales *KMT2C* KO.

*KMT2C* es un gen que se ha visto relacionado con TEA, ya que se ha encontrado mutado en individuos con este trastorno (Koemans et al., 2017). Entre las comorbilidades asociadas al TEA se ha reportado que la ansiedad aparece en un 40% de los casos, lo que también es esperable en modelos murinos (Ricceri et al., 2016). Por lo anterior, buscamos analizar lo que ocurre con la condición *KMT2C* KO mediante pruebas de comportamiento que puedan mostrar la aparición de esta característica. En primera instancia se llevó a cabo la prueba de campo abierto (Figura 25), donde observamos que los animales *KMT2C* KO se comportan de manera similar a la condición control, con una excepción en la distancia recorrida en el centro que es significativamente menor (Figura 25 D), lo que puede interpretarse como que el animal *KMT2C* KO tiene un nivel más elevado de ansiedad que el control al calcular la razón distancia recorrida en el centro/distancia total recorrida (0.05 vs 0.14, respectivamente) (McIlwain et al., 2001). El resto de los parámetros medidos no mostraron diferencias significativas (Figura 25 C, E, F y G).

La prueba de luz y oscuridad (Figura 26), es una de las herramienta más utilizadas que permite medir si existe o no algún tipo comportamiento de tipo ansioso en los animales. Donde la cantidad de veces que pasan a la zona iluminada, en conjunto con el tiempo y distancia que ahí recorren son indicativos de ansiedad (Takao & Miyakawa, 2006). Particularmente la condición *KMT2C* KO no presenta diferencias significativas en esta prueba al ser comparada con el control, pero si presenta fuertes tendencias a pasar un menor tiempo y recorrer menor distancia en la zona iluminada (Figura 26 D y E), lo que podría reforzar la idea de la presencia de un comportamiento del tipo ansioso registrado por la prueba de campo abierto.

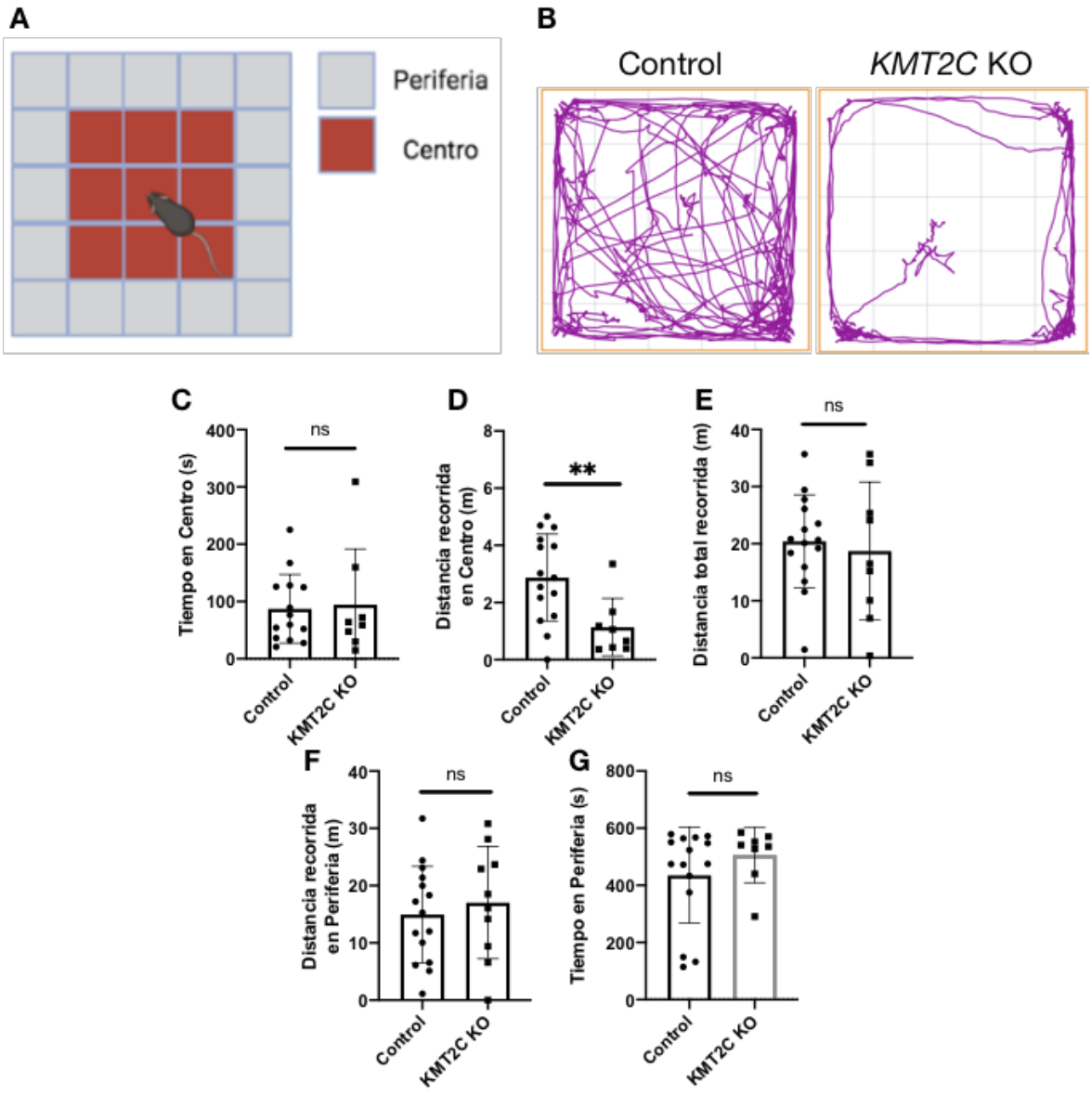



**Figura 25. Prueba de campo abierto en ratones *KMT2C* KO**. Los animales fueron puestos en el centro del campo, grabados por 10 minutos y se monitoreó su comportamiento. **A)** Esquema representativo de la prueba indicando zona central y periferia. **B)** Trayectoria representativa de la condición control y *KMT2C* KO. **C)** Tiempo de permanencia en el centro. **D)** Distancia recorrida en el centro de la prueba. **E)** Distancia total recorrida por los animales. **F)** Distancia recorrida en periferia. **G)** Tiempo de permanencia de los animales en la periferia. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9. T-test ** p 0.0089.

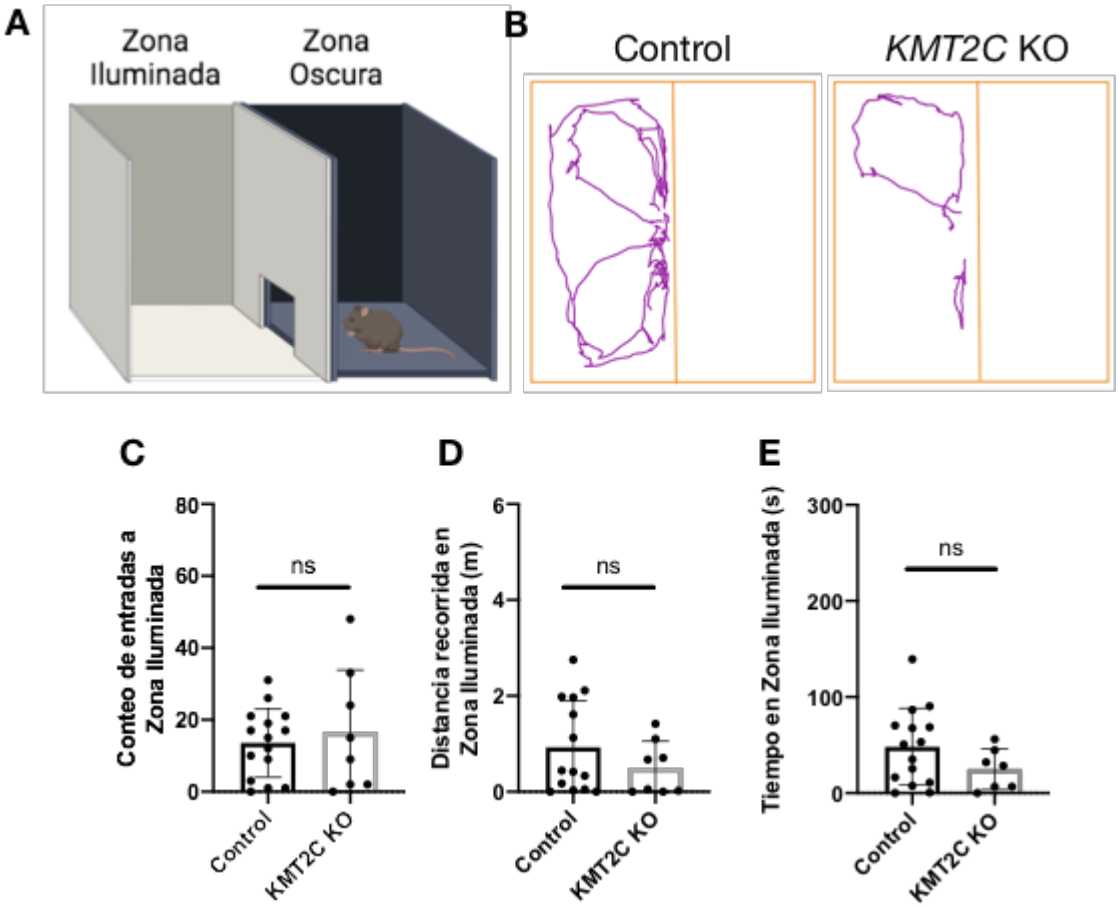



**Figura 26. Prueba de luz y oscuridad en animales *KMT2C* KO.** Animales comenzaron en la zona oscura del aparato, fueron grabados por 10 min y se registró su comportamiento. **A)** Esquema representativo de la prueba. **B)** Trayectorias representativas de condiciones control y *KMT2C* KO. **C)** Número de entradas al compartimiento iluminado. **D)** Distancia recorrida por los animales en la zona iluminada. **E)** Tiempo pasado en el compartimiento iluminado. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9.

La prueba de Laberinto Cero Elevado (Figura 27), es otra forma de medir ansiedad en modelos murinos. Donde los animales menos ansiosos tenderán a explorar más la zona abierta e iluminada en vez de estar en la con menos luz y cerrada (Tucker & McCabe, 2017). De esta forma pudimos observar que no hay diferencias significativas en las trayectorias (Figura 27B) ni en los datos entregados por esta prueba (Figura 27C-H), por lo que no fue posible medir si existe algún tipo de ansiedad por medio de este aparato.

Como última herramienta para medir comportamientos del tipo ansioso y repetitivos, llevamos a cabo la prueba de enterramiento de canicas, donde se monitorea cuántas bolitas son enterradas hasta ⅔ de su capacidad en 30 min. En esta prueba encontramos que no existen diferencias significativas en la cantidad de bolitas enterradas por la condición *KMT2C* KO al ser comparado con el control, pero si se ve una tendencia a que son propensos a enterrar mayor cantidad de bolitas (Figura 28B). La significancia podría ser alcanzada aumentando el número de individuos de la condición *KMT2C* KO.

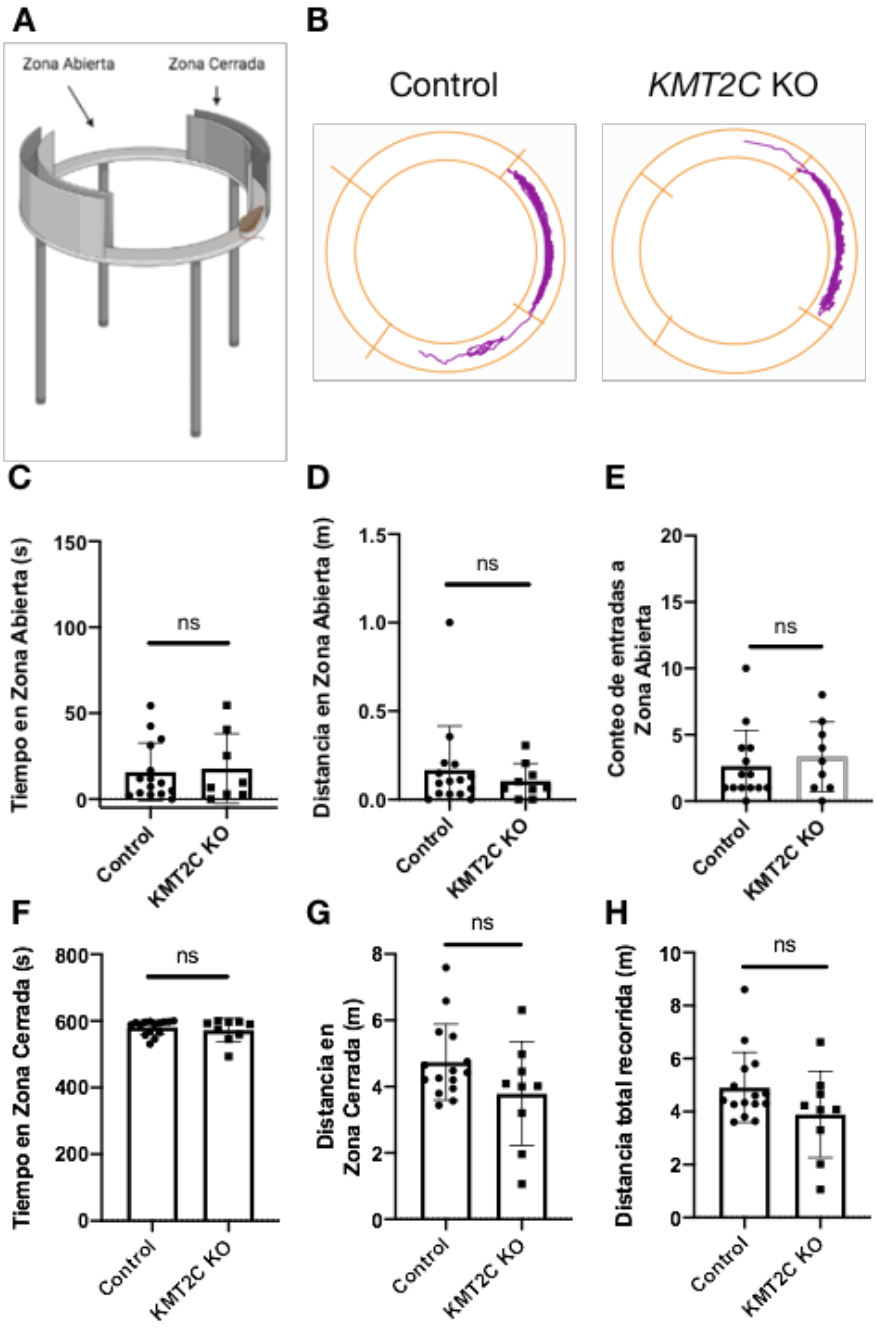



**Figura 27. Prueba del laberinto cero elevado en ratones *KMT2C* KO**. Los animales fueron ubicados mirando hacia sector cerrado y grabados por 10 min para registrar comportamiento. **A)** Esquema representativo del aparato, donde se indica el sector cerrado y abierto. **B)** Trayectorias representativas de la condición control y *KMT2C* KO. **C)** Tiempo que estuvieron los animales en la zona abierta. **D)** Distancia recorrida en zona abierta. **E**) Número de entradas a la zona expuesta. **F)** Tiempo en el sector cerrado. **G)** Distancia recorrida en el sector cerrado. **H)** Distancia total recorrida durante los 10 min de prueba. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15, *KMT2C* KO n = 9.

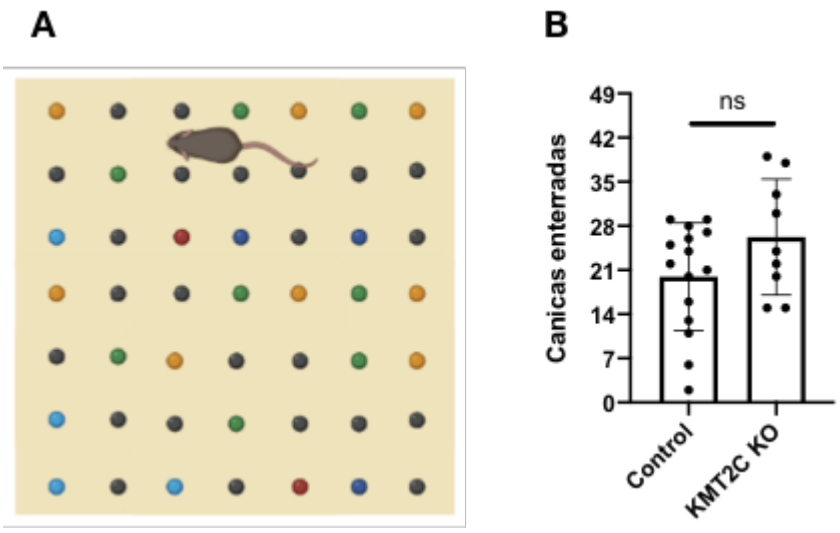



**Figura 28**. **Prueba de enterramiento de canicas en animales *KMT2C* KO.** Los animales fueron puestos en un campo abierto cubierto con viruta de madera y con canicas repartidas uniformemente. **A)** Esquema representativo de la prueba. **B)** El gráfico de barras muestra el número de canicas enterradas hasta ⅔ en 30 min de prueba. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15, *KMT2C* KO n = 9.

### 2.2.2 Comportamientos asociados a la capacidad social de la condición *KMT2C* KO.

Cuando se habla de TEA, los déficits en socialización, comunicación verbal y no verbal son un elemento central de este trastorno. Poco se sabe de los mecanismos neurocognitivos que se encargan de generar este déficit, donde las mutaciones genéticas y el ambiente incrementan la probabilidad de padecer TEA (Franchini et al., 2018; Sealey et al., 2016). Para estudiar qué ocurre en la condición *KMT2C* KO en cuanto la su capacidad social, primero llevamos a cabo la prueba de 3 cámaras (Figura 29), donde observamos que el tiempo de interacción con el animal encerrado y la cantidad de interacciones con el objeto no social son significativamente mayores al ser comparadas con la condición control (Figura 29 B y G). Dejando en evidencia que los animales de condición *KMT2C* KO no tienen problemas de interacción con otros animales, e incluso socializan más que la condición control, pero aún así tienen cierto interés por el objeto no social. Esto refleja un comportamiento social hacia el animal encerrado y curiosidad por el objeto inanimado. El resto de los parámetros medidos no arrojó diferencias significativas al comparar la condición control contra *KMT2C* KO (Figura 29 C, D, E, F).

Rasgos como una disminución en las interacciones sociales y déficits en comunicación, pueden ser investigados con modelos murinos debido a su naturaleza social (Ey et al., 2011). Una prueba que permite medir estos parámetros, es la de interacciones sociales (Figura 30). Observamos que los animales *KMT2C* KO presentan una disminución significativa de las interacciones nariz-anogenital (Figura 30C) y un aumento significativo en los eventos de acicalamiento (Figura 30D). Lo que indica que estos animales no tienen interés en la firma olfativa de un animal desconocido y también que presentan ciertos comportamientos repetitivos, respectivamente. En las interacciones nariz-nariz, nariz-cara y agresiones no encontramos diferencias significativas (Figuras 30 A, B y E).

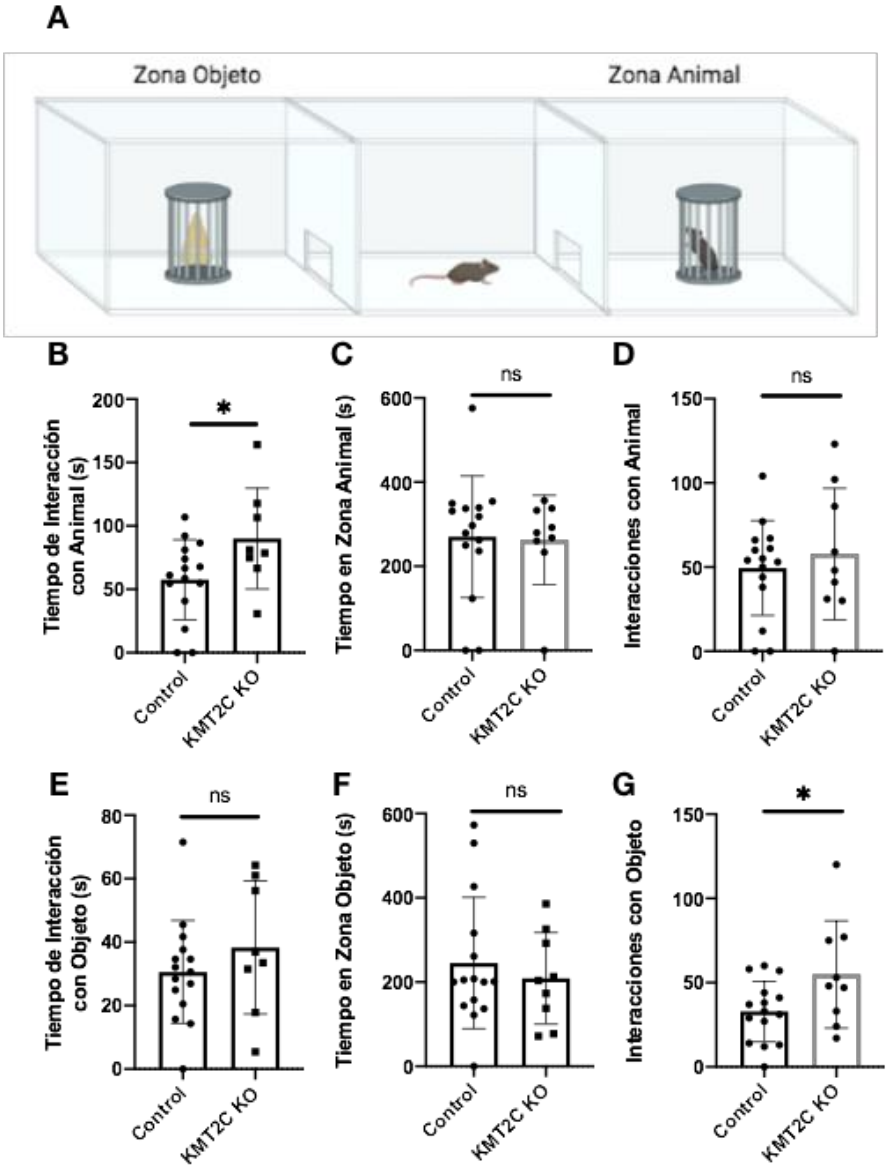



**Figura 29. Prueba de las tres cámaras en ratones *KMT2C* KO.** Los animales se dejaron en el centro del aparato de tres cámaras, se grabó por 10 min y se registró su comportamiento. **A)** Representación de la prueba de 3 cámaras y sus respectivas zonas. **B)** Tiempo de interacción con el animal encerrado. **C)** Tiempo en la zona social o con el animal encerrado **D)** Conteo de interacciones del ratón testeado con el animal encerrado. **E)** Tiempo de interacción con el objeto o estímulo no social. **F)** Tiempo en la zona de exploración del objeto. **G)** Conteo de interacciones con el objeto. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9. T-test B * p 0.0430 y G * p 0.0407.

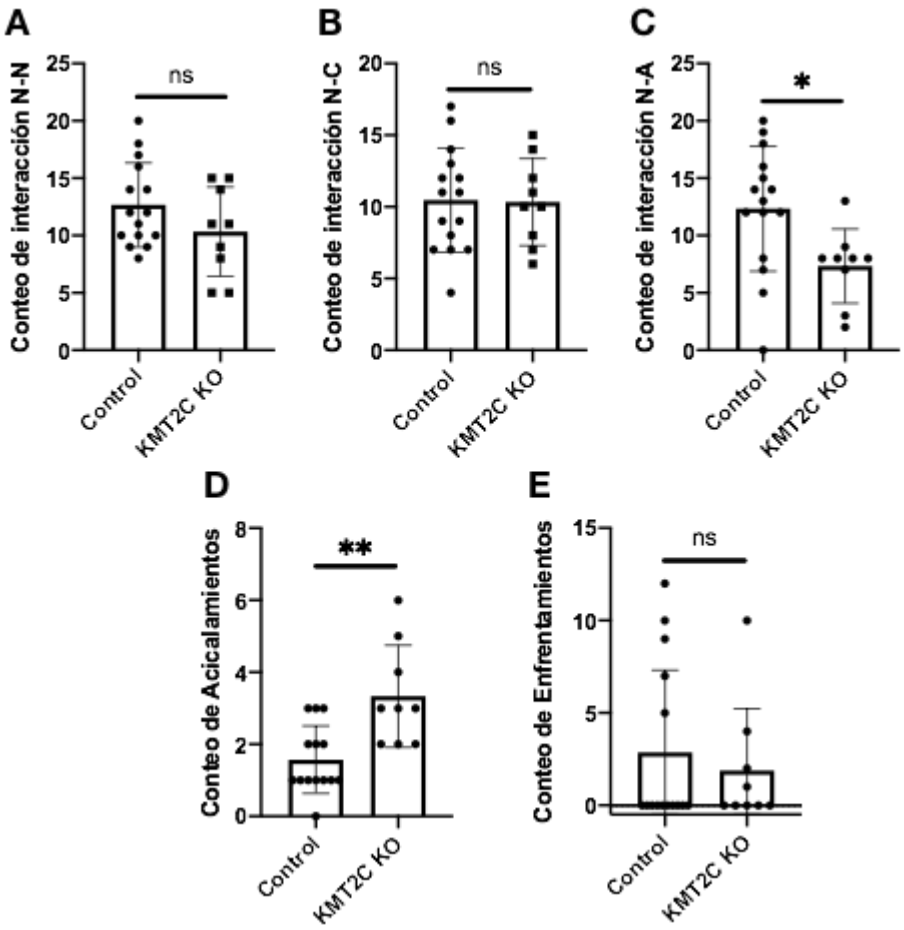



**Figura 30. Prueba de interacciones sociales en animales *KMT2C* KO.** Los animales fueron puestos en una caja oscura durante 10 min para monitorear las interacciones con un ratón desconocido WT del mismo sexo y edad similar. **A)** Conteo de interacciones Nariz-Nariz. **B)** Conteo de interacciones Nariz-Cara. **C)** Conteo de interacciones Nariz-Zona Anogenital. **D)** Conteo de eventos de acicalamientos de los animales. **E)** Conteo eventos de agresividad desde el animal estudiado hacía el ratón WT. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9.

Por último, para determinar qué condición es más dominante frente a la otra, se llevó a cabo la prueba de dominancia del tubo. Se enfrentaron animales del mismo sexo de la forma Control vs *KMT2C* KO de manera aleatoria (Figura 31). Se puede observar, que en promedio los animales *KMT2C* KO ganan un 78.5% de los enfrentamientos frente a la condición control (Figura 31B), dejando en evidencia que son significativamente más dominantes en 3 de 4 días de enfrentamientos, por lo que permanecen en el tubo como un lugar seguro.

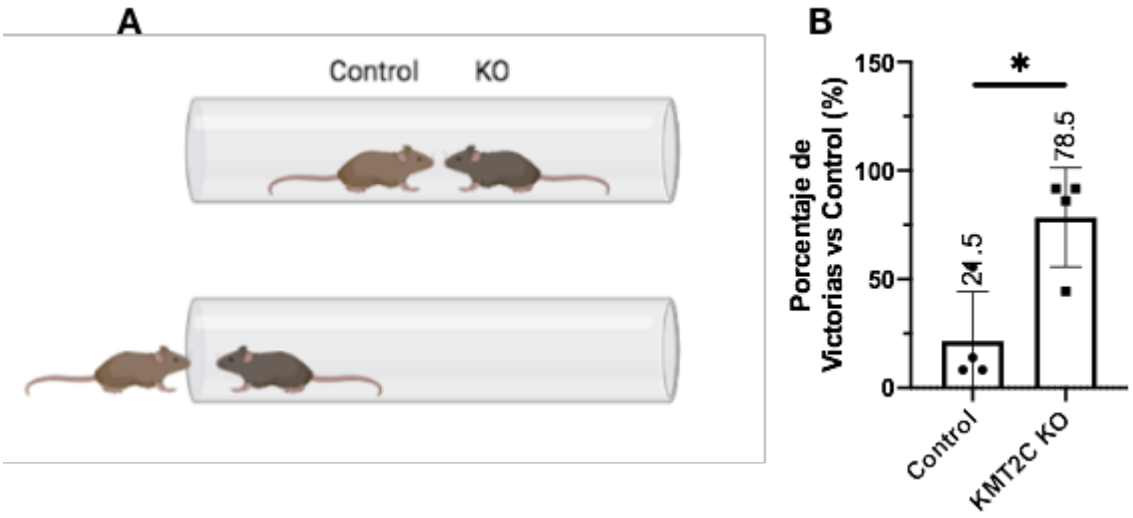



**Figura 31. Prueba de la dominancia del tubo en ratones *KMT2C* KO.** Los animales se entrenaron para entrar al tubo por 5 días, del día 6 al 9 se enfrentaron 3 veces por día a individuos control y *KMT2C* KO aleatoriamente por sexo y se registraron las veces que ganó/perdió cada animal. **A)** Esquema representativo del comienzo y final de la prueba. **B)** En la figura se muestra el promedio de victorias de los 27 enfrentamientos realizados por día. Cada círculo o cuadrado corresponde al porcentaje de victorias de los días 6, 7, 8 y 9 de la condición control y *KMT2C* KO, respectivamente. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15, y *KMT2C* KO n = 9. T-test * p 0.0124.

### 2.2.3 Evaluación de memoria en animales *KMT2C* KO.

Al igual como se evaluó en la condición *KDM6B* KO, quisimos averiguar qué ocurre con la memoria de los animales *KMT2C* KO a través de la prueba de condicionamiento al miedo (Figura 32). Esta prueba no arrojó diferencias significativas al contrastar la información de la condición control y *KMT2C* KO en los eventos ni en el tiempo de freezing (Figuras 32 B y C, respectivamente). Por lo que esta prueba no descarta que existan diferencias en la memoria de los animales.

El último test de la batería de pruebas corresponde al laberinto de Barnes, el cuál permite medir si es que existe alteración en el aprendizaje y memoria espacial a través de distintos parámetros medidos por 4 días consecutivos, donde los animales deben encontrar un agujero de salida entre 19 agujeros falsos con ayuda de símbolos visuales distribuidos en la sala de la prueba mientras se emite un sonido. En la prueba de laberinto de Barnes (Figura 33) no encontramos diferencias significativas en cuanto a la longitud del recorrido primario, distancia total recorrida y latencia primaria (Figura 33 B, D y E, respectivamente). Se observó que al día 5, donde se cambió de lugar el agujero de salida, los animales *KMT2C* KO permanecen significativamente un menor tiempo cerca de la zona de interés en comparación al control, mientras que el resto de los días los animales control permanecían un menor tiempo promedio cerca de la zona de interés (Figura 33C).

Por otro lado en cuanto a la latencia total (Figura 33F), que corresponde al tiempo que tardaron los animales en llegar al agujero de salida y esconderse, observamos que el día 2 posterior al entrenamiento, los animales de condición *KMT2C* KO demoran significativamente mucho más tiempo en llegar a la salida al compararse con la condición control, pero a lo largo de los días se ve que este tiempo disminuye denotando así un aprendizaje más lento.

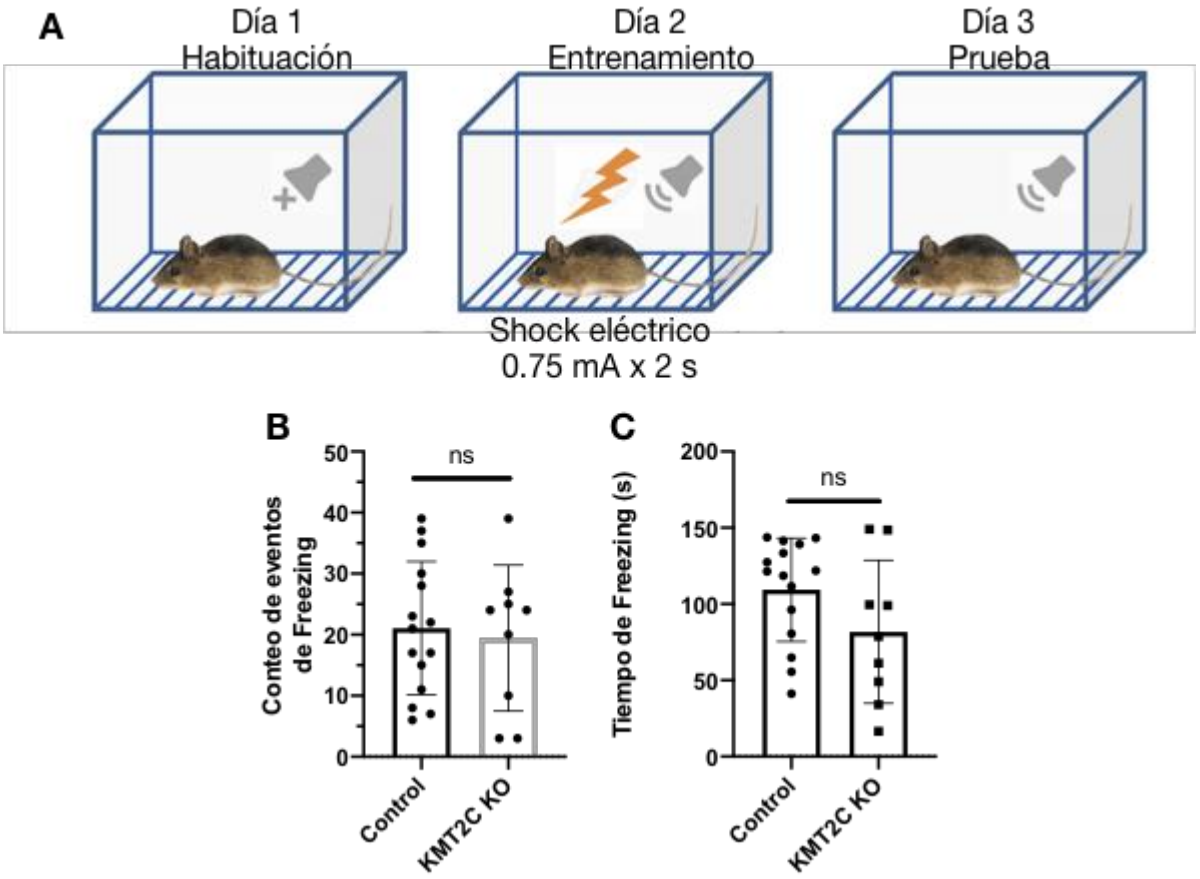



**Figura 32**. **Prueba de condicionamiento al miedo en animales *KMT2C* KO. A)** Esquema representativo de la prueba de comportamiento. En el primer día se habituaron en una caja y en el segundo, utilizando el mismo aparato, se sometieron a un sonido de 3000 Hz a 85 db por 2.5 min. y shock eléctrico de 0.75 mA por 2 segundos. Al tercer día se realizó la prueba, cambiando la caja y emitiendo el sonido sin shock eléctrico para obtener: **B)** Conteo de eventos de *freezing* de los animales durante la reproducción del sonido. **C)** Tiempo de *freezing* por cada animal durante la reproducción del sonido. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9.

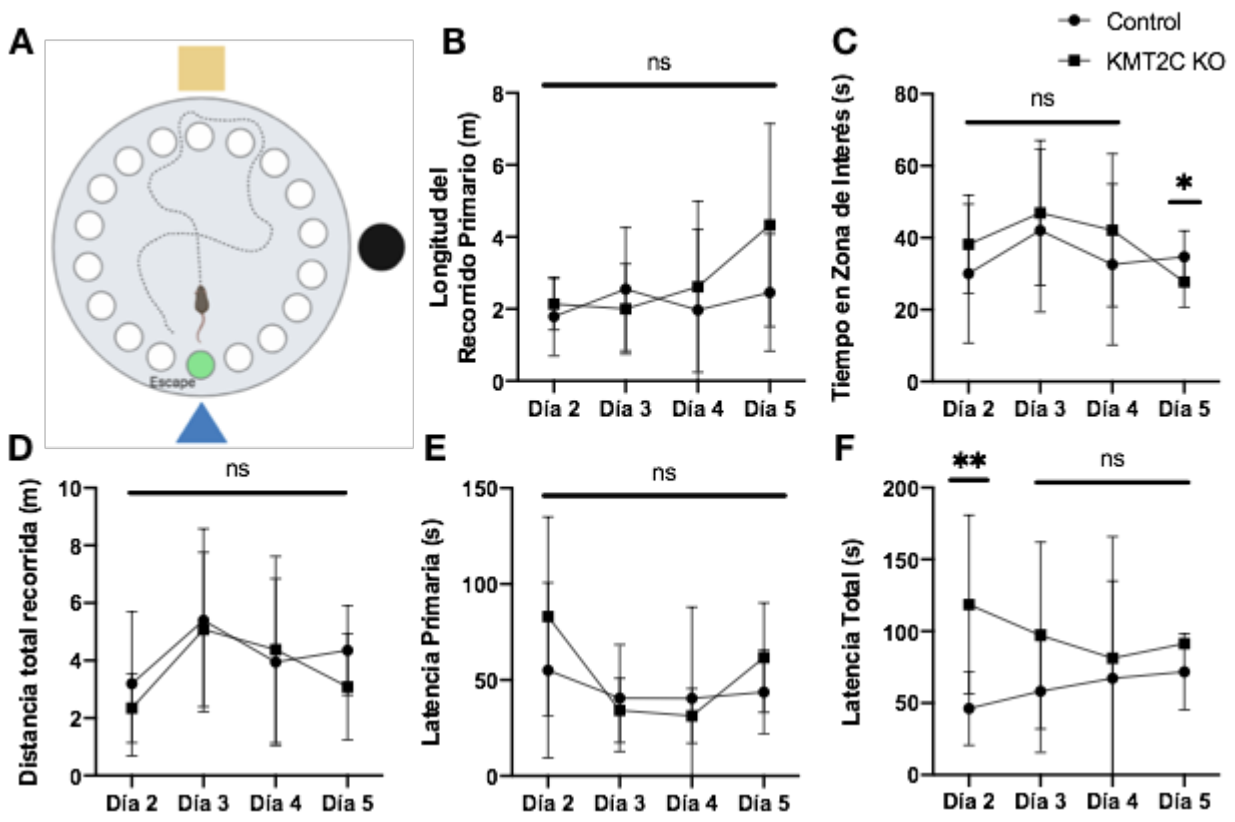



**Figura 33. Prueba de Laberinto de Barnes en ratones *KMT2C* KO.** Los animales entrenaron para entrar a la caja de escape mediante señales visuales por 4 días y se registró su comportamiento. El día 5 se cambió el lugar de escape, se grabó y se registró su comportamiento. **A)** Esquema representativo de la prueba. **B)** Longitud del recorrido primario de los animales del día 2 al 5. **C)** Tiempo pasado por los animales en la zona de interés, cerca de la caja de escape. **D)** Distancia total recorrida durante la duración de la prueba. **E)** Latencia primaria de los animales. **F)** Latencia total registrada de los días 2 al 5. Los datos representan el promedio ± SEM. Control n = 15 y *KMT2C* KO n = 9. T-test C * p 0.0325 y F ** p 0.0037.

## VI. Discusión

Es de interés para la investigación del Trastorno del Espectro Autista el generar nuevos modelos animales que permitan obtener información sobre los comportamientos asociados a cada gen y modelo, para entender cómo se desarrolla el TEA y con el fin de poder compararlos con lo que ocurre en humanos, contribuyendo a que los individuos que presentan este trastorno tengan un mayor bienestar (Lord et al., 2020). Hasta la fecha, existen diversos modelos de ratón con mutaciones en genes que han sido identificados con TEA que permiten estudiar *in vivo* la fisiología y comportamiento asociados a tales alteraciones que son tan complejos y diversos como lo que ocurre con individuos con TEA (Ey et al., 2011). Entre ellos se encuentran genes asociados a estructura sináptica, ensamblaje y estabilización como *Neurexina 1a*, proteínas de andamiaje como *Shank3,* maduración y regulación sináptica como *FmrP* y también asociados a regulación de la expresión génica como *Mecp2* y *Chd8* (Ey et al., 2011; Platt et al., 2017).

Los hallazgos obtenidos en este trabajo permitirán contribuir a la investigación del TEA para entender cómo se está produciendo este trastorno y qué fenotipos y/o comportamientos se manifiestan en animales KO para *KDM6B* y *KMT2C*, que son comparables a individuos humanos que presentan TEA a través de distintos paradigmas (Ey et al., 2011; Chang et al., 2017). Se ha reportado en la literatura que alteraciones en genes que codifican para enzimas modificadoras de histonas del tipo lisina metiltransferasa o demetilasa producen desórdenes en el neurodesarrollo, lo que podría vincularse directamente con el trastorno (Stolerman et al. 2019; Koemans et al., 2017).

### 1.1 Análisis de expresión de la condición *KDM6B* KO y la marca H3K27me3.

Pudimos verificar por medio de la técnica de inmunofluorescencia que la infección mediada por AAV en el cerebro fue efectiva al observar el corte histológico completamente de color rojo y también se pudo editar el genoma de los animales Cas9 KI al expresar el ARN guía dirigido contra la secuencia que codifica para la enzima *KDM6B*, gracias a la acción de la cápside PHP.eB que presenta una alta eficiencia de transducción en neuronas (Chan et al., 2017), esto verificado por el ensayo Surveyor (Figura 6). Utilizando un anticuerpo específico contra *KDM6B* y luego un anticuerpo secundario que lo reconozca, fue posible evidenciar la baja de expresión de la enzima al comparar la condición KO con la control (Figura 4 A-H). Esta baja de expresión causó el efecto esperado en cuanto a las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas epigenéticas al producir un aumento de la marca H3K27me3 cuando se compara a la condición control mediante western blot (Figura 5), como se encontró anteriormente en cultivos neuronales de ratón (Brauer, 2022). Una posible explicación al mecanismo de cómo la falta de función de *KDM6B* está produciendo TEA en los individuos se puede dar por la actividad de *Top2a,* un gen que codifica para una topoisomerasa y que se ha visto que colocaliza con PRC2, quien cataliza la marca H3K27me3. Esta triple colocalización se encuentra altamente enriquecida en genes de riesgo de autismo. Así *Top2a* es un gen que se cree influencia en la expresión de diversos genes involucrados en el desarrollo social y que antagonizan el silenciamiento génico de PRC2 y la marca H3K27me3, tal como lo hace *KDM6B* (Geng et al., 2022).

Luego de realizar el screening de genes candidatos, no observamos cambios de expresión de ARNm en *DCX* que está involucrado en la formación y regulación de microtúbulos, jugando un rol importante en el cerebro en desarrollo (Reiner, 2013). Tampoco cambió su expresión *NeuN* (Figura 7), que se expresa exclusivamente en neuronas y es un regulador de la diferenciación neuronal

mediante el splicing alternativo de ARNs, siendo así fundamental para el desarrollo del cerebro (Lin et al., 2016).

Los niveles de ARNm asociados a los genes analizados están estrechamente relacionados al desarrollo neuronal, por lo que es de esperar que el KO de *KDM6B* afecte la expresión de alguno de ellos, ya que es regulador de la cromatina. Por una parte, existe evidencia de que el receptor de NMDA y sus subunidades *NR2A* y *NR2B* juegan un papel crítico en la plasticidad sináptica y dendritogenesis. Donde el receptor *NR2B* promueve la reorganización estructural de las conexiones neuronales y *NR2A* facilita su estabilidad (Bustos et al., 2014). Encontramos que el ARNm de ambos receptores disminuye significativamente su expresión cuando la enzima *KDM6B* está KO, dando cuenta de una posible regulación de la expresión por parte de esta enzima (Figura 7). En el caso de *PSD95,* se asocia a la regulación en la maduración sináptica y plasticidad al funcionar como una proteína de andamiaje de los receptores de glutamato con proteínas de señalización en la sinapsis excitatoria. Se ha visto que *PSD95* es regulado por *PRC2* de manera negativa, y por *KDM6B* de manera positiva (Henriquez et al., 2013), por lo que si disminuye la expresión de *KDM6B* esperaríamos una baja en la expresión de *PSD95*, ya que no podría promoverse su expresión por la acumulación de la marca H3K27me3 tal como encontramos en la Figura 7. Dando cuenta así una gran desregulación en la transmisión sináptica, dada por la baja expresión de *NR2A, NR2B* y *PSD95*. También encontramos que *KCC2B*, un co-transportador neuronal de iones de K y Cl esencial para la modulación de la transmisión sináptica inhibitoria, cuya expresión aumenta en el desarrollo temprano del cerebro (Jones et al., 2022), interesantemente se ve regulado de manera negativa cuando se realiza un KO de la enzima *KDM6B* (Figura 7). Lo que daría cuenta de una regulación epigenética que depende la remoción de la marca represiva H3K27me3 por parte de *KDM6B*. *KCC2B* se ha visto involucrado en varios modelos de TEA y se cree que juega un papel fundamental en la sintomatología y retardo en la madurez (Smalley et al., 2020). Con esta información, se confirma que la enzima *KDM6B* estudiada en esta

investigación regula procesos neuronales necesarios para el correcto desarrollo y funcionamiento del cerebro, y que su desregulación puede influir en la aparición de rasgos TEA.

En la base de datos ENCODE, buscamos y revisamos los experimentos de Chip-Seq disponibles para observar las regiones enriquecidas cercanas a *KDM6B*. Encontrando así para la marca H3K27me3 y *KDM6B* genes asociados o relacionados a TEA como *Tmem88* asociado al desarrollo vía Wnt/B-catenina (Martinez et al., 2015) y *Chd3* que juega un rol importante en los procesos de neurodesarrollo (Mizukami et al., 2021).

### 1.2 Asociación de la pérdida de función de *KDM6B* con comportamientos tipo TEA.

Individuos con mutaciones en *KDM6B* y que han sido diagnosticados con TEA, presentan ansiedad, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), problemas de comunicación, discapacidad intelectual, entre otros. (Stolerman et al., 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, se sugiere con los datos obtenidos al realizar pruebas de comportamiento en ratones KO para *KDM6B* que existe algún grado de hiperactividad, impulsividad o capacidad motora aumentada a través de la prueba de Rotarod (Figura 8B), ya que los animales con esta condición permanecen un tiempo significativamente mayor en esta prueba si se compara con el control. Estudios recientes en Mayo de este año reportan que ratones con haploinsuficiencia de *KDM6B* también presentan un fenotipo y comportamiento similar al TEA, corroborando así un rasgo que puede observarse tanto en humanos como en ratones (Gao et al., 2022). Por otro lado, también se encontró que existe un grado de disminución de la ansiedad en la condición *KDM6B* KO en comparación con el control, ya que en la prueba de Laberinto Cero Elevado (Figura 11 C y E) se observan diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que los animales pasan en la zona abierta y también en la cantidad de entradas a ésta (Cook et al., 2002), reflejando así un menor miedo por el entorno que les permite explorar con libertad.

Uno de los elementos distintivos del TEA son los comportamientos repetitivos que se han asociado al estriado, corteza, hipotálamo, cerebelo y amígdala (Kim et al., 2016). En modelos de ratón, hay conductas marcadas que representan esta característica tales como auto-acicalamiento, saltos, dar vueltas y enterramiento de canicas (Kim et al., 2016). En cuanto a la condición *KDM6B* KO pudimos observar que posee rasgos de este tipo, ya que en el test de interacciones sociales hay un aumento significativo del número de veces que se acicalan frente a la condición control (Figura 14D). Por otro lado, en la prueba de enterramiento de canicas tienen una alta tendencia a enterrar más bolitas que la condición control, tal valor podría ser significativo aumentando el número animales de la condición *KDM6B* KO (Figura 12).

Otro de los problemas característicos de los individuos con TEA es su baja o falta de interacción social, que en modelos animales puede medirse por ejemplo, con la prueba de tres cámaras e interacciones sociales (Crawley, 2007). Particularmente en la información obtenida luego de realizar la prueba de tres cámaras no obtuvimos datos relevantes (Figura 13), no obstante en el test de interacciones sociales frente a animales *wild type* desconocidos de edad similar y del mismo sexo, registramos que los animales *KDM6B* KO presentan una reducción significativa en la interacción nariz-anogenital (Figura 14C). Esta interacción es del tipo exploratoria y es una forma habitual de este tipo de animales, ya que la utilizan para obtener información sobre el otro individuo debido a los olores urinarios, revelando así la firma olfativa que contiene la identidad, género y receptividad social (Zou et al., 2008; Garner, s.f.); este parámetro evidenció un déficit en la interacción social por parte de los animales *KDM6B* KO frente a otros ratones. Complementando la información obtenida a través de las pruebas de interacciones sociales (Figura 14) y enterramiento de canicas (Figura 12) que miden rasgos característicos del TEA, se puede afirmar que los animales *KDM6B* KO tienen rasgos autistas y no un trastorno obsesivo compulsivo ya que, además de los comportamientos repetitivos, tienen una falta de socialización con otros individuos (Kim et al., 2016).

La prueba de dominancia del tubo es capaz de determinar dominancia social y jerarquía que impacta directamente en la sobrevivencia, éxito reproductivo, salud mental y física de los animales (Zhou et al., 2018). La condición *KDM6B* KO, al igual que la control, fueron entrenados durante 5 días con el fin de que aprendieran a pasar por el tubo de un lado a otro. Los 4 últimos días se realizaron enfrentamientos contra animales de edad similar y mismo sexo completamente aleatorios, para así registrar las victorias/derrotas de cada uno, lo que corresponde al animal que permaneció en el tubo y al que fue expulsado de él respectivamente. La dominancia social ejercida por parte de los animales *KDM6B* KO contra los controles es significativamente superior, ya que en promedio ganan un 62.1% en los 4 días de prueba, equivalente a las victorias obtenidas en 27 enfrentamientos diarios (Figura 15). Este resultado puede ser consecuencia de la aversión social representada en la prueba de interacciones sociales (Figura 14) y también por la impulsividad o hiperactividad detectada en Rotarod, similar a lo reportado en el modelo de autismo de *Scn2a* KO (Tatsukawa et al., 2020). Por otro lado, no se detectaron alteraciones en memoria o aprendizaje con las pruebas de condicionamiento al miedo y laberinto de Barnes, ya que en este último las curvas de aprendizaje son similares entre controles y *KDM6B* KO (Figura 16 y 17).

**2.1 Análisis de expresión de la condición *KMT2C* KO y las marcas postraduccionales H3K4me1 y H34Kme3.**

A través de la técnica de inmunofluorescencia verificamos la eficiencia de la infección mediada por el AAV que contiene el ARNg contra *KMT2C* al mostrar una clara reducción en la expresión de esta enzima al comprar contra la condición control (Figura 19 A-H), también pudimos verificar que el genoma de los animales fue editado con el sistema CRISPR/Cas9 mediante el ensayo Surveyor (Figura 22). Se pudo observar que *KMT2C* colocaliza con el núcleo, como era lo esperado al ser una enzima remodeladora de la cromatina del tipo escritora específica de H3K4. En cuanto a la marcas postraduccionales H3K4me1 y H3K4me3, no pudimos ver diferencia a través de western blot

al comparar la condición *KMT2C* KO con el control (Figura 20), pero es necesario obtener más réplicas experimentales para confirmar esta información ya que se vió previamente en cultivos primarios de neuronas de ratón que el KO altera los niveles de estas marcas, observándose una mayor presencia de la marca H3K4me1 y menor cantidad de H3K4me3 (Brauer, 2022). Los cambios en las marcas pueden no ser detectados debido a una posible compensación por parte de la enzima *KMT2D* que se ha descrito que está involucrada en la regulación de H3K4me1 en ratones y mamíferos (Herz et al., 2012). Se ha reportado que en líneas celulares HCT116 KO para *KMT2C* la marca H3K4me1 no parece verse afectada, pero en cambio cuando se realiza un doble KO de *KMT2C* y *KMT2D*, la marca se ve afectada de manera negativa. Esto sugiere que la enzima *KMT2D* es capaz de compensar parcialmente la actividad metiltransferasa en ausencia de *KMT2C* (Lee et al., 2013), pero al realizar el análisis de expresión del ARNm en los animales de condición *KMT2C* KO observamos una disminución de la expresión de *KMT2D* (Figura 21), lo que justificaría que no existen cambios en las marcas asociadas H3K4me1 y H3K4me3 en la corteza cerebral. A través de la metodología utilizada, si bien no vemos cambios en dichas marcas y postulamos que existe cierta compensación, no podemos saber si esa compensación o la no pérdida de la marca de las histonas ocurre en los mismos genes blanco.

Tras realizar el screening de genes previamente descritos en la sección 2.1, encontramos que *DCX, NeuN*, *NR2A*, *NR2B* ni *PSD95* presentan bajas significativas en su expresión cuando la enzima *KMT2C* se encuentra KO. Por lo que *KMT2C* podría no estar involucrado en la activación de genes marcadores de neuronas inmaduras y tampoco de neuronas maduras, según los genes analizados (Figura 23). A excepción de *KCC2B*, ya que encontramos que el ARNm disminuye significativamente su expresión en la condición *KMT2C* KO (Figura 23). Lo anterior sugiere que la expresión de *KCC2B* está dada por las marcas activadoras H3K4me1 y H3K4me3 catalizadas por la metiltransferasa *KMT2C*. Interesantemente, el ARNm asociado a este co-transportador de $K^+/Cl^-$ se ve regulado de

manera negativa en las condiciones *KDM6B* KO y *KMT2C* KO, dejando en evidencia una regulación epigenética compartida, que depende la remoción de la marca represiva H3K27me3 por parte de *KDM6B* y una mayor presencia de las marcas activadoras de *KMT2C* para una completa activación transcripcional (Figuras 5,7, 20 y 23)

**2.2 Asociación de la pérdida de función de *KMT2C* con comportamientos tipo TEA.**

De manera paralela, para *KMT2C* también llevamos a cabo los análisis de comportamiento y encontramos algunas diferencias con respecto al fenotipo tipo TEA. La disfunción de *KMT2C* se asocia comúnmente al síndrome Kleefstra que se caracteriza por discapacidad intelectual, hipotonía infantil, rasgos faciales distintivos y características autistas como problemas de socialización, comunicación, ansiedad y también a TEA por sí solo. (Kleefstra & de Leeuw, 2010; Lavery et al., 2020; Koemans et al., 2017). En los animales de condición *KMT2C* KO no detectamos problemas motricidad con la prueba de Rotarod  al no presentar diferencias significativas al ser comparado con el control (Figura 24). Encontramos que los animales *KMT2C* KO presentan algunos rasgos ansiosos, los que fueron registrados a través de la baja distancia recorrida en el centro en la prueba de campo abierto (Figura 25D; McIlwain et al., 2001). Esto en conjunto con las tendencias observadas en la prueba de luz y oscuridad (Figura 26 D y E) y en la prueba de enterramiento de canicas (Figura 28), podemos detectar la presencia de un comportamiento de tipo ansioso característico del fenotipo TEA. En cuanto al mecanismo de este rasgo, se ha reportado sobre los estados de ansiedad, que dependen de la evitación de amenazas regulados por redes cerebrales que participan en dicho control a través de la actividad coordinada del núcleo basolateral de la amígdala, hipocampo ventral y corteza prefrontal (Kirouac, 2021). Por otro lado, la prueba de laberinto cero elevado no muestra diferencias relevantes en cuanto a este rasgo (Figura 27).

Asociado a la ansiedad, y como uno de los elementos distintivos del TEA se encuentran los comportamientos repetitivos que pueden ser medidos en modelos murinos con pruebas como el enterramiento de canicas, donde pudimos observar una tendencia por parte de los animales *KMT2C* KO a enterrar más bolitas que la condición control (Figura 28), y por otra parte encontramos que los animales de esta condición exhiben un interés individual y reiteradamente auto-acicalan un número mayor de veces frente a un animal desconocido (Figura 30D), dejando en evidencia la existencia un comportamiento repetitivo (Chang et al., 2017).

En general, los rasgos asociados al TEA poseen varios niveles. Por ejemplo, en cuanto a la interacción social con otras personas esta puede ser muy alta o baja dependiendo del individuo, llegando a ser muy sociables y también curiosos debido a la gran variabilidad del TEA, como se ha reportado en algunos casos (Diehl et al., 2010). La condición *KMT2C* KO presenta un comportamiento similar a lo descrito anteriormente. A través de la prueba de 3 cámaras con la que se busca evaluar preferencia de los ratones por un contexto social frente a uno no social (Ricceri et al., 2016), se evidenció que esta condición pasa un mayor tiempo interactuando con el animal y también interactúan significativamente un número mayor de veces con el objeto no social (Figura 29 B y G, respectivamente), reflejando así un comportamiento social con curiosidad en ambas situaciones. En cambio cuando los animales están en un contexto distinto, como el de la prueba de interacciones sociales donde los animales testeados y *wild type* están libres en la caja para ser monitoreados (Figura 30), encontramos que la condición *KMT2C* KO registra un número significativamente menor de interacciones del tipo nariz-anogenital en comparación al control (Figura 30C). Con lo anterior se refleja un déficit social por parte de estos animales al interactuar con otros individuos desconocidos libres en la caja, donde no tienen un gran interés en averiguar la identidad, género y receptividad social del otro animal (Zou et al., 2008). Otra característica encontrada en los animales *KMT2C* KO es su alta dominancia social cuando enfrentan a la condición control en la prueba de dominancia del tubo,

ya que se registró que ganan en promedio un 78.5% de los enfrentamientos (Figura 31B), lo que no es muy común en individuos con TEA pero aún así puede ocurrir (Farmer & Aman, 2011).

Finalmente, con respecto a la memoria evaluada en la prueba de condicionamiento al miedo, no se presentan diferencias significativas en el conteo de eventos y tiempo *freezing* en los grupos experimentales (Figura 32 B y C), sugiriendo así que los animales no tienen problemas en la formación de memoria a largo plazo. Por otro lado, con la prueba de laberinto de Barnes (Figura 33), pudimos evidenciar que los animales *KMT2C* KO pasan un menor tiempo cerca de la zona de interés donde se encuentra el agujero de salida en el día que el agujero se cambia de posición (Figura 33C), posiblemente porque demoran más tiempo en encontrar la nueva ubicación del escape según lo observado en cuanto a la latencia total (Figura 33F). En este último parámetro también encontramos que en el día posterior al entrenamiento donde aprenden la ubicación de la salida, existe una gran diferencia en cuanto al tiempo que los animales demoran en encontrar el escape (Figura 33F), posiblemente debido a leves problemas asociados a la memoria y/o aprendizaje espacial dependiente del hipocampo de los animales *KMT2C* KO (Harrison et al., 2009), ya que a lo largo de los días siguientes, la latencia de ambas condiciones es similar.

De la misma manera que para *KDM6B*, buscamos en ENCODE experimentos de Chip-Seq para observar las regiones enriquecidas cercanas a *KMT2C*. En el caso de las marcas H3K4me1,3 y *KMT2C* los genes *Galntl5* involucrado en vías de metabolismo de proteínas y glicosilación de mucina (Dwyer & Esko, 2016) y *Prkag2* que es capaz de regular la expresión de otros genes y forma parte de la enzima *AMPK* (Jiao et al., 2020), ambos han sido relacionados al TEA.

### 3. Hallazgos asociados a los animales *KDM6B* y *KMT2C* KO.

Luego de realizar el análisis correspondiente a la batería de 10 pruebas de comportamiento en animales control, *KDM6B* KO y *KMT2C* KO, encontramos que ambas condiciones exhiben un fenotipo de tipo TEA al presentar rasgos distintivos del trastorno como: comportamientos repetitivos,

déficits en interacciones sociales y comunicación, ansiedad, problemas en memoria e hiperactividad. Tal como se ha descrito en individuos que presentan TEA donde se ha podido detectar mutaciones que producen pérdida de función de las enzimas *KDM6B* y *KMT2C* y por lo tanto, comportamientos característicos de este trastorno (Stolerman et al., 2012; Koemans et al., 2017). Si bien a través de RT-qPCR logramos identificar un patrón donde vemos un retraso en la maduración sináptica, es de suma importancia realizar a futuro, un análisis de RNA-Seq de aquellos animales con menor expresión de las enzimas *KDM6B* y *KMT2C*, para obtener información de qué genes están siendo desregulados diferencialmente con el fin de entender cómo se está desarrollando el TEA a causa de otros genes que dependen de la acción epigenética de las enzimas de estudio. Como una forma de resumir los comportamientos encontrados en cada condición se elaboró un gráfico de radar con las 3 condiciones, donde encontramos que existen diferencias claras al comparar las condiciones de estudio con el Control, reflejando así fenotipos TEA distintos para los animales *KDM6B* KO y *KMT2C* KO (Figura 34).

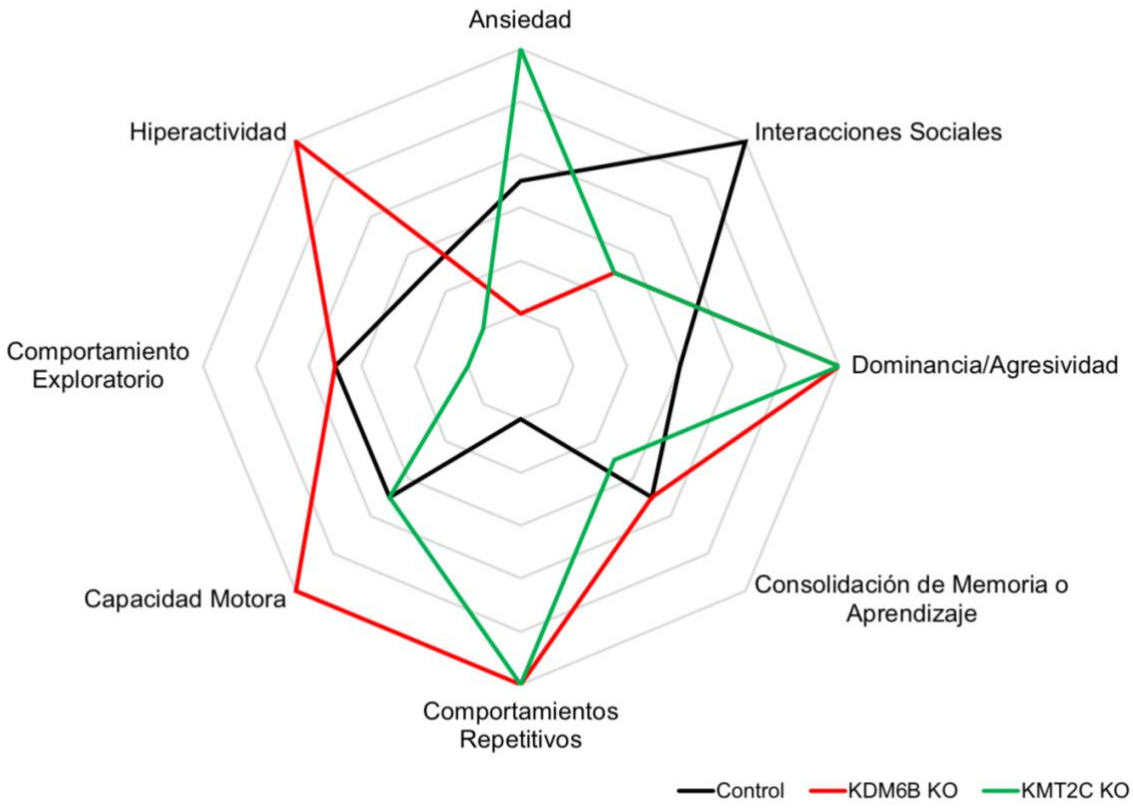



**Figura 34. Comportamientos asociados a las condiciones *KDM6B* KO y *KMT2C* KO.** Lista de comportamientos encontrados en ambas condiciones luego de ejecutar una batería de 10 pruebas de comportamiento para medir ansiedad, sociabilidad, comportamientos repetitivos, entre otros, representados en un gráfico de radar.

## VII. Conclusiones

En este trabajo generamos modelos murinos KO para *KDM6B* y *KMT2C,* con el uso del sistema CRISPR/Cas9 en combinación con el uso de AAV que contienen los ARNg dirigidos a las enzimas, comprobando la baja de expresión del ARN mensajero mediante RT-qPCR y de las enzimas por inmunofluorescencia, así como alteraciones en la marca H3K27me3. Esto con el objetivo de determinar cómo la pérdida de función de las enzimas participa en la aparición de rasgos del TEA, por lo que realizamos una batería de pruebas conductuales para detectar si los animales presentaban comportamientos del tipo TEA, encontrando así dos fenotipos distintos de TEA para las condiciones *KDM6B* KO y *KMT2C* KO debido a la alta variabilidad de este trastorno. Para *KDM6B* KO encontramos que los animales presentan una ansiedad reducida, una leve reducción de interacciones sociales, dominancia, problemas en memoria o aprendizaje, comportamientos repetitivos, capacidad motora e hiperactividad. Por otro lado, *KMT2C* KO exhibe un fenotipo con ansiedad aumentada, dominante, con una leve disminución en la formación de memoria y aprendizaje, comportamientos repetitivos y comportamientos exploratorios reducidos. De esta manera se puede confirmar que ambas condiciones son válidas como modelo de TEA, cada uno asociado a distintos rasgos distintivos del TEA.

Como proyección, se espera validar los cambios de expresión encontrados en el *screening* de genes y realizar un análisis de expresión génica mediante RNA-Seq para descubrir qué otros genes están siendo desregulados y contribuyen a la aparición de rasgos TEA cuando las enzimas *KDM6B* y *KMT2C* pierden su función.

## VIII. Referencias


Banerjee-Basu, S., & Packer, A. (2010). SFARI Gene: An evolving database for the Autism Research Community. *Disease Models & Mechanisms*, *3*(3-4), 133–135. https://doi.org/10.1242/dmm.005439

Banker, S. M., Gu, X., Schiller, D., & Foss-Feig, J. H. (2021). Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. Trends in Neurosciences, 44(10), 793–807. https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.08.005

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, *129*(4), 823–837. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009

Bedbrook, C. N., Deverman, B. E., & Gradinaru, V. (2018). Viral strategies for targeting the Central and Peripheral Nervous Systems. *Annual Review of Neuroscience*, *41*(1), 323–348. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-062048

Bhat, A. N., Landa, R. J., & Galloway, J. C. (2011). Current perspectives on motor functioning in infants, children, and adults with autism spectrum disorders. Physical Therapy, 91(7), 1116–1129. https://doi.org/10.2522/ptj.20100294

Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (the writers, the readers and the erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, *837*, 8–24. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021

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

Brauer, B. (2022). Edición genómica de las enzimas modificadoras de colas de histonas *KDM6B* y *KMT2C* asociadas al trastorno del espectro autista en cultivos neuronales de ratón in vitro [Tesis de pregrado no publicada]. Universidad Andrés Bello, Chile.

Bradke, F., Di Giovanni, S., & Fawcett, J. (2020). Neuronal Maturation: Challenges and Opportunities in a Nascent Field. Trends in Neurosciences. doi:10.1016/j.tins.2020.02.005

Burchfield, J. S., Li, Q., Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2015). JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *67*, 148–157. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.006

Bustos, F. J., Varela-Nallar, L., Campos, M., Henriquez, B., Phillips, M., Opazo, C., Aguayo, L. G., Montecino, M., Constantine-Paton, M., Inestrosa, N. C., & van Zundert, B. (2014). PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors. PLoS ONE, 9(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094037

Casanova, E. L., & Casanova, M. F. (2014). Genetics studies indicate that neural induction and early neuronal maturation are disturbed in autism. Frontiers in Cellular Neuroscience, 8. doi:10.3389/fncel.2014.00397

Chan, K. Y., Jang, M. J., Yoo, B. B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.-L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S. K., Deverman, B. E., & Gradinaru, V. (2017). Engineered aavs for efficient noninvasive gene delivery to the central and Peripheral Nervous Systems. *Nature Neuroscience*, *20*(8), 1172–1179. https://doi.org/10.1038/nn.4593

Chang, Y. C., Cole, T. B., & Costa, L. G. (2017). Behavioral phenotyping for autism spectrum disorders in mice. *Current Protocols in Toxicology*, *72*(1). https://doi.org/10.1002/cptx.19

Cook, M. N., Crounse, M., & Flaherty, L. (2002). *Behavior Genetics*, *32*(2), 113–118. https://doi.org/10.1023/a:1015249706579

Costa, V., Aprile, M., Esposito, R., & Ciccodicola, A. (2012). RNA-seq and human complex diseases: Recent accomplishments and future perspectives. *European Journal of Human Genetics*, *21*(2), 134–142. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.129

Cotney, J., Muhle, R., Sanders, S. et al. (2015). The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. Nat Commun 6, 6404. https://doi.org/10.1038/ncomms7404

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

Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*, *70*(5), 813–829. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019

Diehl, S., Wegner, J., & Rubin, E. (2010). Children with autism spectrum disorders: Three case studies. The ASHA Leader, 15(1), 14–17. https://doi.org/10.1044/leader.ftr2.15012010.14

Dwyer, C. A., & Esko, J. D. (2016). Glycan susceptibility factors in autism spectrum disorders. Molecular aspects of medicine, 51, 104–114. https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.07.001

Ey, E., Leblond, C. S., & Bourgeron, T. (2011). Behavioral profiles of mouse models for Autism Spectrum Disorders. *Autism Research*, *4*(1), 5–16. https://doi.org/10.1002/aur.175

Fagan, R. J., & Dingwall, A. K. (2019). Compass Ascending: Emerging clues regarding the roles of MLL3/KMT2C and MLL2/KMT2D proteins in cancer. *Cancer Letters*, *458*, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.05.024

Farmer, C. A., & Aman, M. G. (2011). Aggressive behavior in a sample of children with autism spectrum disorders. Research in Autism Spectrum Disorders, 5(1), 317–323. https://doi.org/10.1016/j.rasd.2010.04.014

Farzaneh, M., Kuchaki, Z., Rashid Sheykhahmad, F., Meybodi, S. M., Abbasi, Y., Gholami, E., Ghaedrahmati, F., & Anbiyaee, O. (2022). Correction to: Emerging roles of JMJD3 in cancer. Clinical and Translational Oncology, 24(10), 2044–2044. https://doi.org/10.1007/s12094-022-02871-2

Feliciano, P., Zhou, X., Astrovskaya, I., Turner, T. N., Wang, T., Brueggeman, L., Barnard, R., Hsieh, A., Snyder, L. A. G., Muzny, D. M., Sabo, A., Gibbs, R. A., Eichler, E. E., O'Roak, B. J., Michaelson, J. J., Volfovsky, N., Shen, Y., & Chung, W. K. (2019). Exome sequencing of 457 autism families recruited online provides evidence for autism risk genes. *Npj Genomic Medicine*, *4*(1). https://doi.org/10.1038/s41525-019-0093-8

Franchini, M., Duku, E., Armstrong, V., Brian, J., Bryson, S. E., Garon, N., Roberts, W., Roncadin, C., Zwaigenbaum, L., & Smith, I. M. (2018). Variability in verbal and nonverbal communication in infants at risk for autism spectrum disorder: Predictors and outcomes. Journal of Autism and Developmental Disorders, 48(10), 3417–3431. https://doi.org/10.1007/s10803-018-3607-9

Gao, Y., Aljazi, M. B., & He, J. (2022). KDM6B haploinsufficiency causes ASD/ADHD-like behavioral deficits in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *16*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.905783

Garcia, R., Ayala, P., & Perdomo, S. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud.* 10 (1):59-71.

Garner, J. (s.f.). *Investigate – anogenital*. Mouse Ethogram. Visitado el día 26 de Noviembre, 2022, https://mousebehavior.org/investigate-anogenital/

Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2018). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 392(1), 1–18. https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y

Geng, Y., Zhang, T., Alonzo, I. G., Godar, S. C., Yates, C., Pluimer, B. R., Harrison, D. L., Nath, A. K., Yeh, J.-R. J., Drummond, I. A., Bortolato, M., & Peterson, R. T. (2022). TOP2A promotes the development of social behavior via PRC2 and h3k27me3. Science Advances, 8(47). https://doi.org/10.1126/sciadv.abm7069

Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: A dynamic mark in Health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, *13*(5), 343–357. https://doi.org/10.1038/nrg3173

Grewal, S. I. S., & Moazed, D. (2012). Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression, 1–6. http://doi.org/10.1126/science.1086887

Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., & Zhou, B. (2015). Advanced applications of RNA sequencing and challenges. *Bioinformatics and Biology Insights*, *9s1*. https://doi.org/10.4137/bbi.s28991

Harrison, F. E., Hosseini, A. H., & McDonald, M. P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes Maze Spatial Memory Tasks. Behavioural Brain Research, 198(1), 247–251. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015

Henriquez, B., Bustos, F. J., Aguilar, R., Becerra, A., Simon, F., Montecino, M., & van Zundert, B. (2013). EZH1 and EZH2 differentially regulate PSD-95 gene transcription in developing

hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *57*, 130–143. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.07.012

Herz, H.-M., Mohan, M., Garruss, A. S., Liang, K., Takahashi, Y.-hei, Mickey, K., Voets, O., Verrijzer, C. P., & Shilatifard, A. (2012). Enhancer-associated H3K4 monomethylation by trithorax-related, the drosophila homolog of mammalian MLL3/MLL4. Genes & Development, 26(23), 2604–2620. https://doi.org/10.1101/gad.201327.112

Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.-ha, Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., … Wigler, M. (2012). De Novo Gene Disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*, *74*(2), 285–299. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009

Jiao, J., Zhang, M., Yang, P., Huang, Y., Hu, X., Cai, J., Yang, C., Situ, M., Zhang, H., Fu, L., Guo, K., & Huang, Y. (2020). Identification of De Novo JAK2 and MAPK7 Mutations Related to Autism Spectrum Disorder Using Whole-Exome Sequencing in a Chinese Child and Adolescent Trio-Based Sample. Journal of molecular neuroscience : MN, 70(2), 219–229. https://doi.org/10.1007/s12031-019-01456-z

Jones, E. F., Butler, M. K. G., Trendafilova, D., Mendez, M. S., Jernigan, L. A., Gahtan, E., & Steele, J. (2022). In vivo tracking of KCC2B expression during early brain development. Journal of Comparative Neurology, 531(1), 48–57. https://doi.org/10.1002/cne.25411

Jozwik, K. M., Chernukhin, I., Serandour, A. A., Nagarajan, S., & Carroll, J. S. (2016). Foxa1 directs H3K4 monomethylation at enhancers via recruitment of the methyltransferase MLL3. *Cell Reports*, *17*(10), 2715–2723. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.028

Kim, H., Lim, C.-S., & Kaang, B.-K. (2016). Neuronal mechanisms and circuits underlying repetitive behaviors in mouse models of autism spectrum disorder. *Behavioral and Brain Functions*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s12993-016-0087-y

Kirouac, G. J. (2021). The paraventricular nucleus of the thalamus as an integrating and relay node in the brain anxiety network. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 15. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.627633

Kleefstra, T. & de Leeuw, N. (2010). Kleefstra Syndrome. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK47079/

Koemans, T. S., Kleefstra, T., Chubak, M. C., Stone, M. H., Reijnders, M. R., de Munnik, S., Willemsen, M. H., Fenckova, M., Stumpel, C. T., Bok, L. A., Sifuentes Saenz, M., Byerly, K. A., Baughn, L. B., Stegmann, A. P., Pfundt, R., Zhou, H., van Bokhoven, H., Schenck, A., & Kramer, J. M. (2017). Functional convergence of histone methyltransferases EHMT1 and KMT2C involved in intellectual disability and autism spectrum disorder. *PLOS Genetics*, *13*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006864

Komberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). Twenty-Five Years of the Nucleosome, Review Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome, 1–10.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693–705. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005

Krishnakumar, R., & Blelloch, R. H. (2013). Epigenetics of cellular reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development*, *23*(5), 548–555. https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.06.005

Lai, B., Lee J.-E., Jang, Y., Wang, L., Peng, W. and Ge, K. (2017). MLL3/MLL4 are required for CBP/p300 binding on enhancers and super-enhancer formation in brown adipogenesis, 1–16. http://doi.org/10.1093/nar/gkx234

Lavery, W. J., Barski, A., Wiley, S., Schorry, E. K., & Lindsley, A. W. (2020). KMT2C/D Compass Complex-associated diseases [KCDCOM-ads]: An emerging class of congenital regulopathies. Clinical Epigenetics, 12(1). https://doi.org/10.1186/s13148-019-0802-2

Lee, J.-E., Wang, C., Xu, S., Cho, Y.-W., Wang, L., Feng, X., Baldridge, A., Sartorelli, V., Zhuang, L., Peng, W., & Ge, K. (2013). H3K4 mono- and Di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. ELife, 2. https://doi.org/10.7554/elife.01503

Lederer, D., Grisart, B., Digilio, M. C., Benoit, V., Crespin, M., Ghariani, S. C., Maystadt, I., Dallapiccola, B., & Verellen-Dumoulin, C. (2012). Deletion of KDM6A, a histone

demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome. American journal of human genetics, 90(1), 119–124. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.021

Lin, Y.-S., Wang, H.-Y., Huang, D.-F., Hsieh, P.-F., Lin, M.-Y., Chou, C.-H., Wu, I.-J., Huang, G.-J., Gau, S. S.-F., & Huang, H.-S. (2016). Neuronal splicing regulator RBFOX3 (neun) regulates adult hippocampal neurogenesis and synaptogenesis. PLOS ONE, 11(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164164

Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E. J., Jones, R. M., Pickles, A., State, M. W., Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4

Maenner, M. J., Shaw, K. A., Baio, J., Washington, A., Patrick, M., DiRienzo, M., Christensen, D. L., Wiggins, L. D., Pettygrove, S., Andrews, J. G., Lopez, M., Hudson, A., Baroud, T., Schwenk, Y., White, T., Rosenberg, C. R., Lee, L.-C., Harrington, R. A., Huston, M., … Dietz, P. M. (2020). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years — autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2016. *MMWR. Surveillance Summaries*, *69*(4), 1–12. https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6904a1

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, *339*(6121), 823-826. http://doi.org/10.1126/science.1231143

Martinez, R. A., Stein, J. L., Krostag, A. R., Nelson, A. M., Marken, J. S., Menon, V., May, R. C., Yao, Z., Kaykas, A., Geschwind, D. H., & Grimley, J. S. (2015). Genome engineering of isogenic human ES cells to model autism disorders. Nucleic acids research, 43(10), e65. https://doi.org/10.1093/nar/gkv164

Maury, E., & Hashizume, R. (2017). Epigenetic modification in chromatin machinery and its deregulation in pediatric brain tumors: Insight into epigenetic therapies, 1–18. http://doi.org/10.1080/15592294.2016.1278095

McIlwain, K. L., Merriweather, M. Y., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2001). The use of behavioral test batteries: Effects of training history. Physiology & Behavior, 73(5), 705–717. https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00528-5

Mizukami, M., Ishikawa, A., Miyazaki, S., Tsuzuki, A., Saito, S., Niihori, T., & Sakurai, A. (2021). A de novo CHD3 variant in a child with intellectual disability, autism, joint laxity, and dysmorphisms. Brain and Development, 43(4), 563–565. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.12.004

Park, D. H., Hong, S. J., Salinas, R. D., Liu, S. J., Sun, S. W., Sgualdino, J., Testa, G., Matzuk, M. M., Iwamori, N., & Lim, D. A. (2014). Activation of neuronal gene expression by the JMJD3 demethylase is required for postnatal and adult brain neurogenesis. Cell Reports, 8(5), 1290–1299. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.060

Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., Dahlman, J. E., Parnas, O., Eisenhaure, T. M., Jovanovic, M., Graham, D. B., Jhunjhunwala, S., Heidenreich, M., Xavier, R. J., Langer, R., Anderson, D. G., Hacohen, N., Regev, A., Feng, G., … Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, *159*(2), 440–455. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014

Platt, R. J., Zhou, Y., Slaymaker, I. M., Shetty, A. S., Weisbach, N. R., Kim, J.-A., Sharma, J., Desai, M., Sood, S., Kempton, H. R., Crabtree, G. R., Feng, G., & Zhang, F. (2017). CHD8 mutation leads to autistic-like behaviors and impaired striatal circuits. *Cell Reports*, *19*(2), 335–350. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.052

Reiner, O. (2013). LIS1 and DCX: Implications for brain development and human disease in relation to microtubules. Scientifica, 2013, 1–17. https://doi.org/10.1155/2013/393975

Ricceri, L., Michetti, C., & Scattoni, M. L. (2016). Mouse behavior and models for Autism Spectrum Disorders. Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability, 269–293. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800109-7.00017-0

Rutten, B. P., & Mill, J. (2009). Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophrenia Bulletin*, *35*(6), 1045–1056. https://doi.org/10.1093/schbul/sbp104

Sanders, M. J., Wiltgen, B. J., & Fanselow, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. European Journal of Pharmacology, 463(1-3), 217–223. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01283-4

Satterstrom, F. K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., De Rubeis, S., An, J.-Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., … Walters, R. K. (2020). Large-scale exome sequencing study implicates both developmental and functional changes in the neurobiology of autism. *Cell*, *180*(3), 568–584. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036

Sealey, L. A., Hughes, B. W., Sriskanda, A. N., Guest, J. R., Gibson, A. D., Johnson-Williams, L., Pace, D. G., & Bagasra, O. (2016). Environmental factors in the development of Autism Spectrum Disorders. Environment International, 88, 288–298. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.021

Sertçelik, M., Uğur, Ç., Şahin Aközel, A., & Gürkan, C. K. (2016). A Child with Kabuki Syndrome and Autism Spectrum Disorder. Noro psikiyatri arsivi, 53(3), 280–282. https://doi.org/10.5152/npa.2015.10099

Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian Fear Conditioning: A cellular and molecular perspective. Trends in Neurosciences, 24(9), 540–546. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01969-x

Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G. and Zhang, F. (2013). Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Science, 343(6166), 84-87. 1–5. http://doi.org/10.1126/science.1247005

Smalley, J. L., Kontou, G., Choi, C., Ren, Q., Albrecht, D., Abiraman, K., Rodriguez Santos, M. A., Bope, C. E., Deeb, T. Z., Davies, P. A., Brandon, N. J., & Moss, S. J. (2020). The K-cl co-transporter 2 is a point of convergence for multiple autism spectrum disorder and epilepsy risk gene products. https://doi.org/10.1101/2020.03.02.973859

Stolerman, E. S., Francisco, E., Stallworth, J. L., Jones, J. R., Monaghan, K. G., Keller-Ramey, J., Person, R., Wentzensen, I. M., McWalter, K., Keren, B., Heron, B., Nava, C., Heron, D., Kim, K., Burton, B., Al-Musafri, F., O'Grady, L., Sahai, I., Escobar, L. F., … Louie, R. J. (2019).

Genetic variants in the *kdm6b* gene are associated with neurodevelopmental delays and dysmorphic features. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *179*(7), 1276–1286. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61173

Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., & Luber, G. (2007). Barnes Maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. Protocol Exchange. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.390

Takao, K., & Miyakawa, T. (2006). Light/dark transition test for mice. Journal of Visualized Experiments, (1). https://doi.org/10.3791/104

Tang, Q.-Y., Zhang, S.-F., Dai, S.-K., Liu, C., Wang, Y.-Y., Du, H.-Z., Teng, Z.-Q., & Liu, C.-M. (2020). UTX regulates human neural differentiation and dendritic morphology by resolving bivalent promoters. *Stem Cell Reports*, *15*(2), 439–453. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.015

Tatsukawa, T., Raveau, M., Ogiwara, I., Hattori, S., Miyamoto, H., Mazaki, E., Itohara, S., Miyakawa, T., Montal, M., & Yamakawa, K. (2019). SCN2A haploinsufficient mice display a spectrum of phenotypes affecting anxiety, sociability, memory flexibility and Ampakine CX516 rescues their hyperactivity. Molecular Autism, 10(1). https://doi.org/10.1186/s13229-019-0265-5

Tran, N., Broun, A., & Ge, K. (2020). Lysine demethylase KDM6A in differentiation, development, and cancer. Molecular and Cellular Biology, 40(20). https://doi.org/10.1128/mcb.00341-20

Tucker, L. B., & McCabe, J. T. (2017). Behavior of male and female C57BL/6J mice is more consistent with repeated trials in the elevated zero maze than in the elevated plus maze. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 11. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00013

Veneti, Z., Gkouskou, K., & Eliopoulos, A. (2017). Polycomb Repressor Complex 2 in genomic instability and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8), 1657. https://doi.org/10.3390/ijms18081657

Wang, P., Lin, C., Smith, E. R., Guo, H., Sanderson, B. W., Wu, M., Gogol, M., Alexander, T., Seidel, C., Wiedemann, L. M., Ge, K., Krumlauf, R., & Shilatifard, A. (2009a). Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase

II. Molecular and Cellular Biology, 29(22), 6074–6085. https://doi.org/10.1128/mcb.00924-09

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009b). RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, *10*(1), 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

White, S. W., Oswald, D., Ollendick, T., & Scahill, L. (2009). Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Clinical Psychology Review*, *29*(3), 216–229. https://doi.org/10.1016/j.cpr.2009.01.003

Williams, K., Christensen, J., Rappsilber, J., Nielsen, A. L., Johansen, J. V., & Helin, K. (2014). The histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B is recruited to p53 bound promoters and enhancer elements in a p53 dependent manner. PLoS ONE, 9(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096545

Wolffe, A. P. (1994). Transcription: In tune with the histones. *Cell*, *77*(1), 13–16. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90229-1

Yáñez, C., Maira, P., Elgueta, C., Brito, M., Crockett, M. A., Troncoso, L., López, C., & Troncoso, M. (2021). Estimación de la prevalencia de trastorno del espectro autista en población Urbana Chilena. *Andes Pediatrica*, *92*(4), 519–525. https://doi.org/10.32641/andespediatr.v92i4.2503

y, R. K., Merico, D., Bookman, M., L Howe, J., Thiruvahindrapuram, B., Patel, R. V., Whitney, J., Deflaux, N., Bingham, J., Wang, Z., Pellecchia, G., Buchanan, J. A., Walker, S., Marshall, C. R., Uddin, M., Zarrei, M., Deneault, E., D'Abate, L., Chan, A. J., … Scherer, S. W. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*, *20*(4), 602–611. https://doi.org/10.1038/nn.4524

Zhou, T., Sandi, C., & Hu, H. (2018). Advances in understanding neural mechanisms of social dominance. Current Opinion in Neurobiology, 49, 99–107. https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.006

Zou, H., Zhang, C., Xie, Q., Zhang, M., Shi, J., Jin, M., & Yu, L. (2008). Low dose MK-801 reduces social investigation in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *90*(4), 753–757. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.06.002