



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”

**ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC): BUTIRATO COMO VÍA DE
COMUNICACIÓN MICROBIOTA-CEREBRO Y FACTOR DE REESTRUCTURACIÓN
FISIOLÓGICA DURANTE EL NEURODESARROLLO PERINATAL EN MODELO RATÓN**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE BACHILLER EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

IVAN JESUS PORTOCARRERO RUIZ

ASESORAS:

DRA. CARLA GALLO LOPEZ-ALIAGA

DRA. ALEXANDRA CASTILLO-RUIZ

LIMA - PERÚ

2024

ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC): BUTIRATO COMO VÍA DE COMUNICACIÓN MICROBIOTA-CEREBRO Y FACTOR DE REESTRUCTURACIÓN FISIOLÓGICA DURANTE EL NEURODESARROLLO PERINATAL EN MODELO RATÓN

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%	4%	1%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
2	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
3	www.elsevier.es Fuente de Internet	<1%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Universidad Internacional Isabel I de Castilla Trabajo del estudiante	<1%
6	www.frontiersin.org Fuente de Internet	<1%
7	riunet.upv.es Fuente de Internet	<1%

bdigital.uniquindio.edu.co

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
Estado del Arte	3
1. Generalidades: El eje microbiota-intestino-cerebro	3
1.1. Microbiota intestinal y Sistema Nervioso Central (SNC)	3
1.2. Mecanismos de comunicación	3
1.3. Antecedentes: AGCC, butirato, fisiología cerebral y neurodesarrollo	4
2. Efectos en la función cerebral mediados por butirato	6
2.1. Receptores acoplados a proteína G: FFAR2, FFAR3, HCAR2	6
2.2. Transportadores de monocarboxilato acoplados a H⁺ o Na⁺: MCTs/SMCTs	7
3. Neurodesarrollo perinatal en modelo ratón mediado por interacciones de butirato	8
3.1. Neurodesarrollo en ratones en etapa perinatal en medio estéril (GF)	8
3.2. Inhibición de HDACs. Tratamientos de butirato. Modulación de microglía	9
Problema de Investigación	10
Estrategia de Abordaje	11
Referencias Bibliográficas	12

Resumen

Se ha evidenciado recientemente las implicaciones de la microbiota intestinal (MI) en múltiples procesos fisiológicos del hospedero (ej.: función gastrointestinal, ritmo circadiano, señalización inmune, entre otros).¹ La heterogeneidad y susceptibilidad a factores ambientales de la MI en cada individuo, genera discrepancia sobre la magnitud en la que la MI contribuye a la fisiología del hospedero.^{1,2} Persiste una serie de aspectos sobre la MI que no son del todo esclarecidos: p.ej.: Etapas específicas en la vida de un individuo donde se establece la MI, y cómo este factor posteriormente altera el desarrollo y/o fisiología cerebral del hospedero.^{1,2,3} Actualmente se conocen 4 vías principales de comunicación entre la MI y el cerebro: (1) vías neurales, (2) vías endocrinas, (3) vías inmunológicas, (4) metabolitos bacterianos.² Entre los metabolitos bacterianos se encuentran los *ácidos grasos de cadena corta* (AGCC)^{1,3}, siendo 3 los más producidos por la MI: (1) acetato, (2) propionato, (3) butirato (en un ratio de 60:20:20 respectivamente).^{1,4} Se conoce además, las relaciones de los AGCC con ocurrencias fisiopatológicas como la enfermedad de Parkinson, los trastornos de humor, los trastornos del espectro autista, y otros, que sugieren en paralelo, que existiría una relación entre los AGCC y el neurodesarrollo.^{1,3} No obstante, sus efectos en procesos del neurodesarrollo como la eliminación de sinapsis excesivas por células microgliales y en qué medida estos pueden ser o no beneficiosos, no son comprendidos en su totalidad.^{1,4} La presente investigación enfatizará en uno de los AGCC producidos por MI (butirato) y explorará el rol que este presenta en el neurodesarrollo perinatal. Sobre butirato se conoce, en paralelo a sus vías de señalización, su capacidad de inhibir histona deacetilasas (HDACs) y su participación indirecta en la modulación epigenética en la transcripción y expresión proteica (ej.: citoquinas, factores neurotróficos), importantes durante el neurodesarrollo.⁴ Se hipotetiza que la presencia de AGCC (principalmente butirato) sería responsable de los cambios fisiológicos encontrados en el neurodesarrollo perinatal. Se evaluará el efecto del butirato en un modelo de ratonas gestantes a través del silenciamiento de los genes HDAC1/HDAC2, para posteriormente cuantificar niveles de muerte celular y activación de microglía en los neonatos (P3) en condiciones estándar (CC) vs condiciones estériles (GF).

Palabras clave: AGCC, butirato, neurodesarrollo, microbiota, histona deacetilasa, modelo ratón

Abstract

The implications of the gut microbiota (GM) on multiple host physiological processes (e.g., gastrointestinal function, circadian rhythm, immune signaling, among others) have recently been highlighted.¹ The heterogeneity and susceptibility to environmental factors of GM in each individual generates discrepancy about the extent to which GM contributes to host physiology.^{1,2} There remain a number of aspects of GM that are not fully elucidated: e.g., specific stages in an individual's life where GM is established, and how this factor subsequently alters host brain development and/or physiology.^{1,2,3} Currently, 4 main pathways of communication between GM and the brain are known: (1) neural pathways, (2) endocrine pathways, (3) immunological pathways, (4) bacterial metabolites.² Among the bacterial metabolites are short-chain fatty acids (SCFA)^{1,3}, with 3 being the most produced by GM: (1) acetate, (2) propionate, (3) butyrate (in a ratio of 60:20:20 respectively).^{1,4} Furthermore, the relationships of SCFA with pathophysiological occurrences such as Parkinson's disease, mood disorders, autism spectrum disorders, and others are known, suggesting in parallel, that there would be a relationship between SCFA and neurodevelopment.^{1,3} However, their effects on neurodevelopmental processes such as the elimination of excessive synapses by microglial cells and the extent to which they may or may not be beneficial to neurodevelopment are not clear.⁴ The present investigation will emphasize one of the SCFA produced by GM (butyrate) and will explore its role in perinatal neurodevelopment. In parallel to its signaling pathways, butyrate is known to inhibit histone deacetylases (HDACs) and to indirectly participate in epigenetic modulation of transcription and protein expression (e.g., cytokines, neurotrophic factors), important during neurodevelopment.⁴ It is hypothesized that the presence of SCFA (mainly butyrate) would be responsible for the physiological changes found in perinatal neurodevelopment. The effect of butyrate will be evaluated in a pregnant mouse model through the silencing of HDAC1/HDAC2 genes, to subsequently quantify levels of cell death and microglia activation in neonates (P3) under standard conditions (CC) vs. germ-free conditions (GC).

Keywords: SCFA, butyrate, neurodevelopment, microbiota, histone deacetylase, mouse model

Estado del Arte

1. Generalidades: El eje microbiota-intestino-cerebro

1.1. Microbiota intestinal y sistema nervioso central (SNC)

El término *microbiota* hace referencia a la colectividad de microorganismos que residen externa e internamente en un hospedero.¹ Se conocen distintos tipos de microbiota, que poseen características y nichos diferentes dependiendo de la zona del organismo. Se encuentra microbiota en piel, tracto respiratorio, ojos, tracto urogenital y en el tracto gastrointestinal.¹ Este último es conocido como microbiota intestinal (MI), siendo de todas las anteriormente mencionadas, la más abundante en el organismo.¹ Actualmente, se tiene conocimiento parcial de los roles que la MI toma sobre diversos procesos fisiológicos en el hospedero.^{1,2}

Se conoce que la MI genera cambios fluctuantes en el sistema nervioso. Participa en la síntesis de determinados neurotransmisores y metabolitos (ej.: GABA y AGCC respectivamente). Los compuestos de la MI están asociados a cambios conductuales como niveles de ansiedad y depresión, conductas sociales y aptitudes comunicativas. Además, también están a cambios morfológicos como la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, distribución de comunicación nerviosa, neuroinflamación, entre otros. Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, son diversos los factores que indican una comunicación constante entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central (SNC).^{2,3}

1.2. Mecanismos de comunicación

El *eje microbiota-intestino-cerebro* (MIC) es un término relativamente nuevo en el campo de la neurociencia. Es atribuido a los mecanismos de señalización bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el SNC.^{1,2,3} La comunicación del eje MIC representa una simbiosis entre la microbiota y el hospedero. Se ha mostrado que la condición de este eje está relacionada a modulaciones en la función sistémica, tales como:

Alteraciones en la señalización de neurotransmisores, hormonas, y/o agentes inmunes; cambios en los procesos metabólicos: glucosa, índice de masa corporal, entre otros¹; cambios estructurales en regiones del encéfalo: hipotálamo, cuerpo calloso, barrera hematoencefálica (BHE), microglía, entre otros.^{2,3,4}

La funcionalidad del eje MIC ha sido estudiada desde diversas perspectivas. Por ejemplo, se ha analizado el uso de agentes probióticos (ej.: *Lactobacillus sp*), la aplicación de dietas especializadas, el efecto de intervenciones quirúrgicas (ej.: vagotomía), y el impacto sobre el neurodesarrollo en modelos de ratones nacidos en medios estériles (*germ free models*, GF) vs. ratones nacidos en condiciones estándar (CC).^{2,4} La MI tiene una alta susceptibilidad al ambiente y condición de vida del hospedero. La comunicación del eje MIC es fundamental para la condición fisiológica del hospedero. Sin embargo, pese a la reciente relevancia en la investigación de la MI y su función en el sistema nervioso, existen mecanismos y rutas que no son del todo comprendidos.^{1,2} Actualmente, se conocen por lo menos 4 vías de comunicación del eje MIC.² (1) Vías neuronales (ej.: sistema nervioso entérico, nervio vago), (2) Vías endocrinas (ej.: células enteroendocrinas, hormonas peptídicas), (3) Vías inmunológicas (ej.: sistema inmune innato, expresión de citoquinas) y (4) Moléculas de origen bacteriano (ej.: neurotransmisores, lipopolisacáridos, ácidos grasos de cadena corta).

1.3. Antecedentes: AGCC, butirato, fisiología cerebral y neurodesarrollo

Uno de los mecanismos de comunicación del eje MIC está mediado por los metabolitos que producen los microorganismos de la microbiota, que tienen la capacidad de metabolizar componentes en la dieta del hospedero.^{2,3,5} Metabolitos bacterianos como la serotonina, la trimetilamina y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son capaces de mantener la integridad de la BHE.² Los AGCC son ácidos monocarboxílicos pequeños (<6 carbonos), producidos por la fermentación de fibras alimentarias por la microbiota en el tracto gastrointestinal.^{5,6} Entre los AGCC más abundantes en el organismo se registran los siguientes: acetato (C2), propionato (C3), butirato (C4). Están presentes en el colon en una relación molar de 60:20:20 respectivamente. No obstante, las proporciones de estos ácidos en el sistema son

dependientes del sustrato, la composición de la microbiota, y el tiempo de transición en el intestino.^{3,5}

Se sabe que los AGCC pueden interactuar de manera específica con determinados receptores, transportadores y enzimas. Cada uno de estos poseen mayores afinidades a AGCC específicos. Estos complejos proteicos están distribuidos de manera desigual en distintos órganos y tejidos.⁵ En el caso de receptores de AGCC, en su mayoría son receptores acoplados a proteína G. Entre ellos, GPR43, GPR41, y GPR109a (renombrados FFAR2, FFAR3 y HCAR2 respectivamente), son los receptores más revisados en el campo de investigación en microbiota.¹ Además de ellos, existen receptores como OR51E1, OR51E2, GPR42, entre otros.⁴ Los receptores de AGCC suelen asociarse más al sistema nervioso entérico y sistema inmune. Los transportadores de monocarboxilato acoplados a H⁺ o Na⁺, pertenecientes a la familia proteica de MCTs/SMCTs, están relacionados al transporte de ácidos monocarboxílicos a tejidos cerebrales. Los MCTs/SMCTs están estrechamente asociados a múltiples tejidos en el SNC, principalmente expresados en células endoteliales de la BHE, neuronas, astrocitos y glías.^{5,6}

Investigaciones recientes contrastan la idea de que el desarrollo embrionario ocurre en un espacio intrauterino estéril y sugieren que existe una translocación de la MI de la madre al hijo, que indican a su vez, la participación de la MI en el desarrollo embrionario.^{2,7} El neurodesarrollo perinatal es una de las etapas claves en el desarrollo embrionario. Este es modulado por un complejo equilibrio entre factores ambientales y expresión de genes determinados.⁷ Entre algunos de estos genes se encuentran: *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF) y *glial cell line-derived factor* (GDNF).⁸ Estos genes son capaces de modular la activación del sistema inmune innato del cerebro (microglía), las sinapsis en las redes neuronales (*synapse pruning*), la diferenciación y supervivencia de neuronas (apoptosis), y la neurogénesis.^{3,4,8}

Uno de los AGCC más encontrados en el sistema viene a ser el butirato.⁶ Como todos los AGCC, el butirato es producido vía glucólisis. Este mismo es generado por la combinación de 2 moléculas de acetil-CoA (acetoacetil-CoA), que es reducida a butiril-CoA, desde el cual se conocen 2 rutas para la formación de butirato (por acetato

CoA-transferasa o por butirato kinasa).⁹ Pese a que los AGCC pueden también ser sintetizados por el hospedero, estos mecanismos son realizados en mayor medida por determinados grupos de bacterias dentro de la MI. La síntesis de AGCC por MI se asocia frecuentemente a bacterias del phylum Firmicutes, de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* principalmente. En sentido estricto, tomando de partida la síntesis de butirato, se ha visto a las especies *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* y *Ruminococcus bromii* como las principales responsables de la producción de butirato en la microbiota.¹⁰

Se ha demostrado la interacción del butirato con estructuras del cerebro. Por ejemplo, se observa una particular afinidad de butirato como inhibidor de histonas deacetilasas (HDACs), especialmente HDAC1 y HDAC2. Las cuales están asociadas a la regulación epigenética de la transcripción de proteínas expresadas en células gliales y neuronas.^{2,8} La administración de butirato, está asociada a la maduración de microglía, los niveles de K⁺ intracelular implicado en sistemas de señalización en neuronas, la neurogénesis mediante acción de factores neurotróficos, entre otros.^{6,8} **El hecho que exista información que la presencia de butirato se asocia a una gran cantidad de factores en el SNC, es la razón por la que se sugiere también una significativa contribución del butirato al proceso del neurodesarrollo.**

2. Efectos en la función cerebral mediados por butirato

Con respecto al caso de señalización de butirato se conocen 2 tipos de proteínas: (1) Receptores acoplados a proteína G, (2) Transportadores de monocarboxilato acoplados a H⁺ o Na⁺.^{6,8,13}

2.1. Receptores acoplados a proteína G: FFAR2, FFAR3, HCAR2

Entre los receptores más citados se describen a GPR43 y GPR41, renombrados como FFAR2 y FFAR3 (*free fatty acids receptors 2/3*), y GPR109a, denominado HCAR2 (*hydrocarboxylic acid receptor 2*).¹⁴ La distribución de FFAR2 y FFAR3 en regiones del SNC genera discrepancia. Existen reportes sobre estos receptores, que son generalmente expresados en el sistema nervioso entérico (SNE) (ej.: ganglios,

neuronas entéricas y células enteroendocrinas).^{11,12} No obstante, FFARs y HCARs también se encuentran estrechamente asociados a la señalización inmune. Se registran expresiones de estos receptores en células inmunes de forma diferencial (ej.: linfocitos T, leucocitos, macrófagos, entre otros).^{6,13,14,15} Existe información sobre presencia de FFAR2/FFAR3 en el cerebro (neuronas y glías).^{14,15} Sin embargo, estudios como Nøhr et al. (2015) reportan no haber encontrado FFAR3 en tejidos del cerebro.¹² Otro estudio menciona que pese a la ausencia de expresión de FFAR2 en todo tipo de célula en el SNC, el silenciamiento de este receptor (ratones FFAR2^{-/-}) genera cambios en la microglía.¹³ Este contraste entre publicaciones sugiere que la expresión o no expresión de receptores FFARs no es un factor determinante en cuanto a efectos de AGCC (indirectos o directos) vistos en el cerebro respecta. Sin embargo, esto último tampoco puede descartar el rol de FFARs en la modulación de la microglía.^{12,13,14}

Se tiene información más concisa sobre la expresión de GPR109a/HCAR2 en el SNC. Se conocen relaciones entre HCAR2, la activación de microglía y su capacidad de neuroprotección y neuroinflamación.^{16,17} FFARs y HCAR2 presentan afinidad a butirato, la interacción de ambos receptores está relacionada a la modulación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias por la microglía, que como ya se mencionó, conforma el sistema inmune innato en el SNC. Entre estas citoquinas se pueden registrar interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).^{13,15} La modulación de estas citoquinas en el cerebro indican las actividades pro y anti-inflamatoria que son generalmente mediadas por la microglía, que pueden ser derivadas a la señalización de muerte celular de neuronas para una formación eficiente de redes neuronales y la supervivencia de estas **durante las primeras etapas del neurodesarrollo** (*synapse pruning*).^{6,14,17}

2.2. Transportadores de monocarboxilato acoplados a H⁺ o Na⁺: MCTs/SMCTs

Los MCTs/SMCTs son una familia de proteínas, especializada en el transporte de monocarboxilatos cortos como lactato, piruvato y butirato. La funcionalidad de estas estructuras depende de la gradiente de protones (MCTs) o de sodio (SMCTs), generando un transporte unidireccional a través de la membrana plasmática.^{17,18} Pese a que existen por lo menos 10 tipos de MCTs, la isoforma MCT1 es la más

predominante y la que mayor afinidad posee hacia monocarboxilatos (entre ellos butirato). Se ha reportado la presencia de MCT1 en muchos tejidos diferentes, tales como hígado, riñones, corazón, músculo esquelético, intestino y cerebro.¹⁷ MCTs/SMCTs son encontrados en células epiteliales del intestino, y en células endoteliales de la BHE, astrocitos y neuronas.^{19,20} Estas expresiones son un fuerte indicador que esta familia proteica está encargada en gran proporción del transporte de metabolitos bacterianos por la vía circulatoria, incluyendo vías directas de comunicación intestino-cerebro.²⁰ Debido a la naturaleza de MCTs/SMCTs, monocarboxilatos como butirato son capaces de ingresar a distintos tipos de tejidos. Esto permite una interacción directa con histonas deacetilasas, contribuyendo con la modulación de la expresión genética.²¹

3. Neurodesarrollo perinatal en modelo ratón mediado por interacciones de butirato

3.1. Neurodesarrollo en ratones en etapa perinatal en medio estéril (GF)

La actividad de la microglía y el proceso de muerte celular son sucesos vistos en el neurodesarrollo perinatal. Un neonato pierde alrededor del 50% de neuronas en sus etapas iniciales a través de apoptosis, la principal razón de este mecanismo es reducir el exceso de interconexiones neuronales para formar redes neuronales más eficientes.^{22,23} Se ha visto que condiciones ambientales en las que una cría se desarrolla, medio estándar (CC) vs medio estéril (GF), puede relacionarse de manera significativa a variaciones en valores de citoquinas asociadas a muerte celular (aumento en núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), CA1 del hipocampo; disminución en núcleo arcuato del hipocampo).²² También existe evidencia de variaciones en muerte celular en determinadas regiones cerebrales en crías de ratón relacionados a la condición de su nacimiento (vía vaginal o cesárea).²³ Esto último sugiere que esta etapa en el neurodesarrollo perinatal puede verse afectada no solo por las condiciones ambientales en la que se desarrolla la cría, sino también por la forma de nacimiento de las crías, denotándose mayor actividad apoptótica en crías de nacimiento vaginal.^{22,23}

3.2. Inhibición de HDACs. Tratamientos de butirato. Modulación de microglía

Las histonas deacetilasas (HDACs) son un tipo de enzimas capaces de remover el grupo acetil en histonas, inhibiendo la transcripción y expresión de genes. Existen AGCC capaces de inhibir HDACs, siendo butirato el de mayor capacidad inhibitoria en modelos *in vivo* e *in vitro*.²⁴ Se conocen 4 familias de HDACs (clases I-IV), distribuidas en 2 grupos: (a) Dependientes de zinc, denominadas homónimamente HDACs (1-11), distribuidas en las siguientes clases: I (1, 2, 3 y 8), II (4, 5, 6, 7, 9 y 10) y IV (11); (b) Dependientes de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD), denominados SIRT (1-7), todos en la clase III.²⁵ Existe expresión del HDAC1 al HDAC11 en el cerebro, siendo las clases I y II las que presentan mayor afinidad a butirato.⁵ Se sugiere que la actividad de butirato en el cerebro puede darse a través de la regulación de expresión genética por medio de la inhibición de HDACs. Para corroborar esta información, se ha mostrado efectos antiinflamatorios en el cerebro frente a administración de butirato, regulación de expresión de factores neurotróficos en células nerviosas, neuroprotección y neurogénesis.^{26,27,28,29} En adición, estudios recientes mencionan que HDAC1 y HDAC2 pueden relacionarse a alteraciones fisiológicas significativas durante etapas tempranas del neurodesarrollo prenatal en ratones. Los HDACs estarían implicadas además, directa y/o indirectamente, en codificación de interleucinas y TNF- α , modulación de muerte celular, supervivencia de neuronas y consecuente optimización de sinapsis.^{30,31}

Problema de investigación

La producción de AGCC por la microbiota intestinal conforma uno de los principales mecanismos de comunicación del eje microbiota-intestinal-cerebro.⁵ El butirato es uno de los metabolitos bacterianos más investigados, debido a su afinidad inhibitoria de histonas deacetilasas (HDACs) a comparación de otros AGCC. La inhibición de HDACs trae en consecuencia, la modulación epigenética y por ende a la expresión proteica de estructuras importantes durante el neurodesarrollo perinatal de ratones (ej.: citoquinas, interleucinas, factores neurotróficos, entre otros).^{6,30}

Las implicaciones indirectas de butirato a la expresión de diversos genes, como factores neurotróficos, o la modulación de la función proinflamatoria de la microglía (expresión de citoquinas), sugiere que butirato tiene una importante relación con propiedades neuroprotectoras que pueden dar lugar a un rol en el neurodesarrollo temprano.^{26,27,28,29} Al mismo tiempo, estudios recientes evidencian que crías de ratón nacidas en condiciones estándar (CC) vs. ambientes estériles (GF), poseen diferencias en marcadores de muerte celular y activación de microglía, así como cambios morfológicos en determinadas regiones en el SNC^{22,23} que indican la existencia de una transmisión entre la microbiota y el neurodesarrollo perinatal.

Debido a la naturaleza de AGCC y su naturaleza de señalización a través del organismo, se puede considerar a los AGCC como una explicación a cambios encontrados en crías GF vs. CC.^{15,18,22} Tomando en cuenta las características de butirato, se busca explicar diferencias entre las crías de ratón en condiciones CC y GF. **Este proyecto hipotetiza que los cambios en valores de AGCC (principalmente de butirato) influyen fuertemente en estadios tempranos de neurodesarrollo perinatal en ratones.** Esta investigación respondería si la muerte celular vista en las etapas primarias del neurodesarrollo perinatal, puede verse afectada por la alteración de determinadas interacciones de butirato. **Para demostrar ello, se observará al tercer día postnatal (P3), alteraciones en la activación de microglía y producción de citoquinas en ratones neonatos silenciados en HDAC1/HDAC2.**

Estrategia de Abordaje

El método experimental consistirá en 2 fases: (A) Fase I: Butirato en ratones *germ free* (GF) y (B) Fase II: Butirato en ratones HDAC1^{-/-}/HDAC2^{-/-} (KO). La Fase I buscará determinar si el tratamiento de AGCC (butirato) en las madres normaliza los valores de muerte celular y microglía en las crías. Para ello se usarán 3 grupos: CC (grupo control positivo), GF (grupo control negativo) y **GF+But** (administración de butirato, grupo experimental). El butirato se aplicará en su forma soluble, butirato de sodio, en el agua de las madres una semana antes del nacimiento de las crías. Se espera de los resultados en esta primera fase, que los valores del grupo GF+But sean normalizados y por ende similares a los de CC. Debido a que las crías pueden ser indistintamente machos o hembras, se tomará en cuenta el posible efecto del sexo en los resultados obtenidos.

La Fase II buscará determinar si el rol de HDAC1/HDAC2 está relacionado a los efectos de butirato. Esta fase constará de 4 grupos: CC WT (*wild type*), GF WT, GF+But WT y **GF+But KO** (*knock-out*). El *knock-out* en HDAC1^{-/-}/HDAC2^{-/-} será específico para microglía, y se realizará mediante un proceso denominado **ablación inducida** que consta de cruces previos de líneas genéticas (ratones HDAC1^{fl/fl} y HDAC2^{fl/fl} con líneas Cx3cr1Cre o Cx3cr1CreERT2). Este proceso es descrito a detalle en Datta et al. 2018.³¹ En esta segunda fase, se esperaría que los valores vistos en GF+But WT sean parecidos a los de CC WT, mientras que los valores vistos en GF+But KO guarden similitud con los de GF WT (valores no normalizados).

En cuanto a las mediciones realizadas en ambas fases (Fase I y Fase II) estas seguirán el siguiente protocolo: Primero se sacrificará a las crías al tercer día postnatal (P3). Se extraerá sangre arterial del tronco pulmonar y leche materna del estómago de cada cría, los niveles de AGCC serán medidos por cromatografía de gases. También se extraerán cerebros, a los que posteriormente se les realizará cortes coronales, que serán congelados y fijados por secciones. Por último, se usará Caspasa 3 activa (AC3) como marcador de muerte celular, IBA1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) como marcadores de valor referencial a microglía, y se cuantificará la expresión de las citoquinas IL1 β y TNF α (referentes a activación de microglía) mediante q-PCR.²²

Referencias Bibliográficas

1. Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. doi:10.1152/physrev.00018.2018
2. Gars, A., Ronczkowski, N. M., Chassaing, B., Castillo-Ruiz, A., & Forger, N. G. (2021). First encounters: Effects of the microbiota on neonatal brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 682505. doi:10.3389/fncel.2021.682505
3. Morais LH, Schreiber HL 4th, Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Apr;19(4):241-255. doi: 10.1038/s41579-020-00460-0. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33093662.
4. Tang, W., Zhu, H., Feng, Y., Guo, R., & Wan, D. (2020). *The Impact of Gut Microbiota Disorders on the Blood–Brain Barrier. Infection and Drug Resistance, Volume 13, 3351–3363.* doi:10.2147/idr.s254403
5. Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). *The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* doi:10.1038/s41575-019-0157-3
6. Stilling, R. M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*, 99, 110–132. doi:10.1016/j.neuint.2016.06.011
7. Borre, Y. E., O’Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). *Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509–518. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.002
8. Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in endocrinology*, 11, 25. doi:10.3389/fendo.2020.00025
9. Louis, P., & Flint, H. J. (2016). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41. doi:10.1111/1462-2920.13589
10. Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189–200. doi:10.1080/19490976.2015.1134082
11. Nøhr, M. K., Pedersen, M. H., Gille, A., Egerod, K. L., Engelstoft, M. S., Husted, A. S., ... Schwartz, T. W. (2013). *GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as Cosensors for*

- Short-Chain Fatty Acids in Enteroendocrine Cells vs FFAR3 in Enteric Neurons and FFAR2 in Enteric Leukocytes. Endocrinology, 154(10), 3552–3564. doi:10.1210/en.2013-1142*
12. Nøhr, M. K., Egerod, K. L., Christiansen, S. H., Gille, A., Offermanns, S., Schwartz, T. W., & Møller, M. (2015). *Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. Neuroscience, 290, 126–137. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.040*
 13. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mahlakoiv T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermöhlen O, Chun E, Garrett WS, McCoy KD, Diefenbach A, Staeheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci.* 2015 Jul;18(7):965-77. doi: 10.1038/nn.4030. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26030851; PMCID: PMC5528863.
 14. Bisenieks, E., Vigante, B., Petrovska, R., Turovska, B., Muhamadejev, R., Soloduns, V., ... & Mandrika, I. (2021). The specificity and broad multitarget properties of ligands for the free fatty acid receptors FFA3/GPR41 and FFA2/GPR43 and the related hydroxycarboxylic acid receptor HCA2/GPR109A. *Pharmaceuticals, 14(10), 987.*
 15. Wenzel, T. J., Gates, E. J., Ranger, A. L., & Klegeris, A. (2020). *Short-chain fatty acids (SCFAs) alone or in combination regulate select immune functions of microglia-like cells. Molecular and Cellular Neuroscience, 103493. doi:10.1016/j.mcn.2020.103493*
 16. Wakade, C., Chong, R., Bradley, E., Thomas, B., & Morgan, J. (2014). *Upregulation of GPR109A in Parkinson's Disease. PLoS ONE, 9(10), e109818. doi:10.1371/journal.pone.0109818*
 17. Li, G., Shao, K., & Umeshappa, C. S. (2019). *Recent progress in blood-brain barrier transportation research. Brain Targeted Drug Delivery System, 33–51. doi:10.1016/b978-0-12-814001-7.00003-2*
 18. Vijay, N., & Morris, M. E. (2014). Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Current Pharmaceutical Design, 20(10), 1487-1498.*
 19. Moschen, I., Bröer, A., Galić, S., Lang, F., & Bröer, S. (2012). *Significance of Short Chain Fatty Acid Transport by Members of the Monocarboxylate Transporter Family (MCT). Neurochemical Research, 37(11), 2562–2568. doi:10.1007/s11064-012-0857-3*
 20. Gerhart, D. Z., Enerson, B. E., Zhdankina, O. Y., Leino, R. L., & Drewes, L. R. (1997). *Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and*

- glia in adult and suckling rats. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 273(1), E207–E213. doi: 10.1152/ajpendo.1997.273.1.e207
21. Singh, N., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Martin, P. M., Lambert, N. A., Boettger, T., ... & Ganapathy, V. (2010). Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 27601-27608.
 22. Castillo-Ruiz, A., Mosley, M., George, A. J., Mussaji, L. F., Fullerton, E. F., Ruszkowski, E. M., et al. (2018). The microbiota influences cell death and microglial colonization in the perinatal mouse brain. *Brain Behav. Immun.* 67, 218–229. doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.027
 23. Castillo-Ruiz A, Mosley M, Jacobs AJ, Hoffiz YC, Forger NG. Birth delivery mode alters perinatal cell death in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Nov 13;115(46):11826-11831. doi: 10.1073/pnas.1811962115. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30322936; PMCID: PMC6243246.
 24. Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008). *Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(9), 587–593. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.08.002
 25. Volmar, C.-H., & Wahlestedt, C. (2015). *Histone deacetylases (HDACs) and brain function. Neuroepigenetics*, 1, 20–27. doi:10.1016/j.nepig.2014.10.002
 26. Kim, H. J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.-S., Chen, P.-S., & Chuang, D.-M. (2007). *Histone Deacetylase Inhibitors Exhibit Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects in a Rat Permanent Ischemic Model of Stroke: Multiple Mechanisms of Action. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(3), 892–901. doi:10.1124/jpet.107.120188
 27. Park, M. J., & Sohrabji, F. (2016). *The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, exhibits neuroprotective effects for ischemic stroke in middle-aged female rats. Journal of Neuroinflammation*, 13(1). doi:10.1186/s12974-016-0765-6
 28. Wu, X., Chen, P. S., Dallas, S., Wilson, B., Block, M. L., Wang, C.-C., ... Hong, J.-S. (2008). *Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 11(08), 1123. doi:10.1017/s1461145708009024

29. Jaworska, J., Zalewska, T., Sypecka, J., & Ziemka-Nalecz, M. (2019). Effect of the HDAC inhibitor, sodium butyrate, on neurogenesis in a rat model of neonatal hypoxia–ischemia: potential mechanism of action. *Molecular Neurobiology*, 56(9), 6341-6370
30. D’Mello, S. R. (2020). *Regulation of Central Nervous System Development by Class I Histone Deacetylases*. *Developmental Neuroscience*, 1–17. doi:10.1159/000505535
31. Datta, M., Staszewski, O., Raschi, E., Frosch, M., Hagemeyer, N., Tay, T. L., ... Prinz, M. (2018). *Histone Deacetylases 1 and 2 Regulate Microglia Function during Development, Homeostasis, and Neurodegeneration in a Context-Dependent Manner*. *Immunity*, 48(3), 514–529.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.016