

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ygor Parladore Silva

O PAPEL DE METABÓLITOS MICROBIANOS NO PROCESSO
NEURODEGENERATIVO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Rudimar Luiz Frozza

RIO DE JANEIRO

2021

Silva, Ygor Parladore.

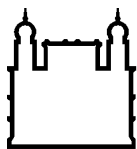
O papel de metabólitos microbianos no processo neurodegenerativo da doença de alzheimer / Ygor Parladore Silva. - Rio de Janeiro, 2021.
96 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Rudimar Luiz Frozza.

Bibliografia: f. 63-81

1. Microbiota intestinal. 2. Ácidos graxos de cadeia curta. 3. Neuroinflamação. 4. Doença de Alzheimer. 5. Neurodegeneração. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: YGOR PARLADORE SILVA

**O PAPEL DE METABÓLITOS MICROBIANOS NO PROCESSO
NEURODEGENERATIVO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Rudimar Luiz Frozza

Aprovada em: 23 / 08 / 2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Flávia Lima Ribeiro Gomes (FIOCRUZ) - **Presidente**
Prof. Dr. Mychael Vinícius da Costa Lourenço (UFRJ) - **Titular**
Prof. Dr. Giselle Fazzioni Passos (UFRJ) - **Titular**
Prof. Dr. Patrícia Cuervo Escobar (FIOCRUZ) - **Revisora**
Prof. Dr. Ana Lúcia Tavares Gomes (UFF) - **Suplente**

Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2021

Dedico este trabalho às pessoas que me acompanharam,
às que me apoiaram e às que me orientaram até aqui.

Agradecimentos

Agradeço primeira e especialmente aos meus pais, Valterci e Vera. Acima de tudo por sempre me amarem, mas também por sempre respeitarem e apoiarem minhas escolhas na vida. Tive um período de grandes decisões e pude contar com seu apoio ao longo de todo esse tempo. É um privilégio ter pais como vocês.

Aos meus irmãos, Yanna, Yuri e Carol, minha cunhada que eu considero uma irmã. À Yanna, apesar de nos desentendemos você ainda é uma amiga e companheira. A Yuri e Carol queria que vocês estivessem aqui para comemorarmos, mas estou muito feliz com todas as conquistas que vocês alcançaram neste período. Parabéns pela mudança e pelas suas filhas queridas, Antonella e Bettina.

À Letícia, minha Leli, meu amor. É difícil imaginar que teria chegado até onde cheguei sem você e mais difícil ainda imaginar um caminho adiante que não seja de nós dois. Você faz tudo valer a pena e me motiva a sempre pensar no melhor futuro para nós. Este foi um ano muito importante para nós dois e sinto que daqui para frente estaremos cada vez mais unidos. Amo muito você.

À minha nova família, por parte da Leli, por me receberem tão gentilmente. Aos meus sogros Lúcio e Mírian, aos tios Sergio, Lílian e Neuza e às avós Tereza e Elza. Obrigado por todo o carinho e todo o apoio que vocês me dão.

Aos meus amigos, os antigos e os novos, obrigado. Ao Lucas e Bernardo, nos vimos pouco este período, mas não perdemos e não perderemos contato. A vida com vocês é mais interessante, as risadas são mais gostosas e os memes são únicos. A todos da equipe de neuro, Áquila, Emanuelle, Juliana, Rafaela e Diego, pelo companheirismo e pelo apoio mútuo nos melhores e nos piores momentos. À Luciana, que já considero uma grande amiga e parceira de trabalho. Aos membros do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT), pela boa convivência e colaboração entre todos. Não é qualquer ambiente de trabalho que agrega tantas pessoas bem-dispostas a trabalhar juntas em prol de todos os envolvidos.

Ao meu orientador, Rudimar Frozza. Obrigado por me receber de braços abertos para o laboratório, por me treinar com tanta paciência e por me mostrar ao longo de todo o mestrado como ser um pesquisador melhor. Porém, acima de tudo, obrigado por sua amizade. Fico muito grato pela boa relação que mantemos, pois sei que o relacionamento entre orientador e orientando é muitas vezes difícil e conturbado. É um privilégio e uma alegria poder trabalhar contigo. Espero que possamos continuar o bom trabalho juntos.

A todos que auxiliaram o andamento deste projeto. À Adriana Bonomo por todo o aconselhamento intelectual que guiou especialmente a parte de imunologia do projeto. À Raquel Martins pelo treinamento e auxílio técnico no uso do microscópio confocal e em outros procedimentos. Aos funcionários da Fiocruz, que tornam possível o funcionamento e excelência da instituição. Ao Laboratório de Doenças Neurodegenerativas (LDN/UFRJ) por produzir, padronizar e fornecer os oligômeros de β -amilóide. Ao Laboratório de Inflamação (Lab-Infla/IOC) por realizar as dosagens de ELISA dos meios de cultivo das culturas organotípicas. Ao Laboratório de Malária (IOC) por ceder o aparato de esquia passiva.

Aos membros da banca avaliadora, Dra. Flávia Gomes, Dr. Mychael Lourenço, Dra. Giselle Fazzioni, Dra. Patrícia Cuervo e Dra. Ana Lúcia Tavares, obrigado desde já pela consideração e pela oportunidade de aprender convosco.

Sumário

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Características e Funções da Microbiota Intestinal	15
1.2. O Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro	17
1.3. Metabolismo e transporte dos SCFAs	21
1.4. Efeitos periféricos/ Mecanismos dos SCFAs	23
1.5. Efeitos dos SCFAs sobre o SNC	25
1.6. Doença de Alzheimer	30
1.7. Influência da Microbiota Intestinal sobre a Doença de Alzheimer	34
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Síntese e caracterização dos oligômeros de A β (A β Os).....	36
3.2. Experimentação animal	37
3.3. Cultura organotípica de hipocampo.....	37
3.4. ELISA.....	39
3.5. Imunofluorescência	40
3.6. Suplementação com SCFAs e injeção intracerebroventricular de oligômeros de A β ...	40
3.7. Depleção da microbiota bacteriana intestinal.....	41
3.8. Teste de supressão alimentar pela novidade.....	42
3.9. Teste de reconhecimento de objeto novo (NOR)	43
3.10. Teste de esconder esferas.....	43
3.11. Teste de nado forçado (FST).....	44
3.12. Teste de esquiva passiva	44
3.13. Avaliação de acetilação de histonas por <i>Western Blotting</i>	45
3.14. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS	46
4.1. Efeito dos SCFAs sobre a neuroinflamação induzida pelos A β Os na cultura organotípica 46	
4.2. Efeito da suplementação com SCFAs sobre a alterações comportamentais induzidas pelos A β Os	49
4.3. Efeito da suplementação com SCFAs sobre alterações comportamentais induzidas pelos A β Os em animais que foram submetidos a depleção da microbiota intestinal	52
4.4. Efeito do butirato sobre a acetilação de histonas.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES PARCIAIS	62
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9. ANEXO I: Artigo de revisão publicado durante o período do mestrado	82

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modificações da microbiota ao longo da vida em associação a estágios de neurodesenvolvimento.....	17
Figura 2: Fonte de síntese, absorção e transporte dos SCFAs da dieta.....	21
Figura 3: Mecanismos de sinalização celular dos SCFAs.....	23
Figura 4: Potenciais vias de comunicação dos SCFAs no eixo microbiota-intestino-cérebro (MIC).....	25
Figura 5: Fisiopatologia da Doença de Alzheimer pela formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares.....	29
Figura 6: Progressão de biomarcadores presentes ao longo da patologia da Doença de Alzheimer.....	32
Figura 7: Esquema da placa de cultura organotípica de hipocampo	37
Figura 8: Desenho experimental da suplementação com SCFAs.....	40
Figura 9: Desenho experimental da depleção da microbiota intestinal por antibióticos de amplo espectro e suplementação com SCFAs.....	41
Figura 10: Butirato de sódio e propionato de sódio reduzem a secreção de citocinas induzida por A β Os in vitro.....	46
Figura 11: Butirato de sódio reduz o número de células da microglia positivas para IBA-1 em fatias de cultura organotípica de hipocampo.....	47
Figura 12: Acompanhamento do peso corporal e consumo de água de camundongos sob suplementação com SCFAs.....	48

Figura 13: Alterações cognitivas e comportamentais em camundongos tratados com SCFAs...	49
Figura 14: Acompanhamento do peso corporal e consumo de água de camundongos tratados com antibióticos e suplementados com SCFAs.....	51
Figura 15: Alterações cognitivas e comportamentais induzidas pelos A β O _s em animais submetidos a depleção da microbiota bacteriana intestinal e suplementados com SCFAs.....	52
Figura 16: Butirato aumenta a acetilação de histonas no hipocampo.....	54

LISTA DE TABELAS

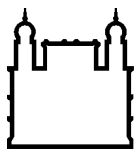
Tabela 1: Soluções utilizadas na cultura organotípica.....	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABX - Coquetel de antibióticos contendo 0,5 mg/mL de ampicilina, 0,5 mg/mL de neomicina, 0,5 mg/mL de metronidazol e 0,25 mg/mL de vancomicina
- APOE - Apolipoproteína E
- APP - Proteína precursora amiloide (*Amyloid precursor protein*)
- A β - Peptídeo β -amiloide (*Amyloid- β*)
- A β O - Oligômeros de β -amiloide (*Amyloid- β oligomers*)
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain derived neurotrophic factor*)
- BHE - Barreira hematoencefálica
- BSA - Albumina bovina sérica (*Bovine serum albumin*)
- CaCl₂ - Cloreto de cálcio
- CD - Grupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CEUA/IOC - Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz
- CR1 - Receptor de complemento 1 (*Complement receptor 1*)
- DMSO - Dimetil sulfóxido anidro
- ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FFAR - Receptor de ácidos graxos livres (*Free fatty acid receptor*)
- FST - Teste de nado forçado (*Forced swim test*)
- FST - Teste De Nado Forçado (*Forced Swim Test*)
- GABA - Ácido γ -aminobutírico (*γ -aminobutyric acid*)
- GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia (*Glia derived neurotrophic factor*)
- GF - Livre de germes (*Germ-free*)
- GLP-1 - Peptídeo similar a glucagon 1 (*Glucagon-like peptide 1*)
- GPCR - Receptor acoplado a proteína G (*G-protein coupled receptor*)
- H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
- H₃BO₄ - Ácido bórico
- HAT - Histona acetil transferase
- HBSS - Solução salina balanceada de Hank (*Hank's balanced saline solution*)
- HCAR - Receptor de ácidos hidrocarboxílicos (*Hydrocarboxylic acid receptor*)
- HDAC - Histona desacetilase
- HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
- HFIP - 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
- HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho (*High performance liquid chromatography*)
HRP - Peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase*)
IBA-1 - Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*)
IBD - Doenças inflamatórias do intestino (*Inflammatory bowel diseases*)
ICV - Intracerebroventricular
IL - Interleucina
KCl - Cloreto de potássio
KH₂PO₄ - Fosfato de potássio dihidrogenado
KPO₄ - Fosfato de potássio
LCR - Líquido cefalorraquidiano
MBT - Teste De Esconder Esferas (*Marble Burying Test*)
MCT - Transportador de monocarboxilato (*Monocarboxylate transporter*)
MEM - Meio essencial mínimo
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
MgSO₄ - Sulfato de magnésio
Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico
NaAc - Acetato de sódio
NaBut - Butirato de sódio
NaCl - Cloreto de sódio
NaProp - Propionato de sódio
NFT - Emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary tangles*)
NGF - Fator de crescimento de neurônios (*Neuron growth factor*)
NIH - Supressão Alimentar Induzida Pela Novidade (*Novelty Induced Hypophagia*)
NOR - Reconhecimento De Objeto Novo (*Novel Object Recognition*)
NOR - Teste de reconhecimento de objeto novo (*Novel object recognition test*)
OR51E1 - Receptor olfatório da família 51 subfamília E membro 1 (*Olfactory receptor Family 51 subfamily E member 1*)
PAT - Teste De Esquiva Passiva (*Passive Avoidance Test*).
PBS - Tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)
p-tau - Proteína tau fosforilada
PYY - Peptídeo YY
ROS - Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)
SCFAs - Ácidos graxos de cadeia curta (*Short-chain fatty acids*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecil xiiulfate*)
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecil xiiulfate polyacrilamide gel electrophoresis*)
SMCT - Transportador de monocarboxilato acoplado a sódio (*Sodium-coupled Monocarboxylate transporter*)
SNC - Sistema nervoso central
SNE - Sistema nervoso entérico
SNP - Sistema nervoso periférico
TBS - Tampão salino de tris (*Tris Buffered saline*)
TBS-T - Tampão salino de tris-tween (*Tris buffered saline-Tween*)
TCA - Ciclo dos ácidos tri-carboxílicos (*Tricarboxylic-acid cycle*)
TGI - Trato gastrointestinal
Th - Linfócito T helper
TNF- α - Fator de necrose tumoral α (*Tumour necrosis factor α*)
T_{reg} - Linfócito T regulador
TREM2 - Receptor de gatilho expresso em células mieloides 2 (*Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2*)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

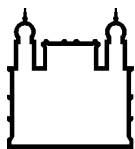
O PAPEL DE METABÓLITOS MICROBIANOS NO PROCESSO NEURODEGENERATIVO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ygor Parladore Silva

A microbiota intestinal tem gerado grande interesse na pesquisa biomédica devido à sua influência sobre fisiologia e patologias humanas. Mais recentemente foi criado o conceito de eixo microbiota-intestino-cérebro como uma via de mão dupla de comunicação. Dentre os vários mecanismos de comunicação da microbiota com o cérebro, a atividade dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) tem se destacado devido a seus numerosos efeitos na fisiologia cerebral e em diversas doenças, como a doença de Alzheimer (DA). A DA é a maior causa de demência no mundo e seu impacto tende a aumentar com o envelhecimento da população mundial. Terapias atuais são capazes apenas de limitar a progressão da doença e existe uma busca ativa por formas de diagnóstico e prevenção. Neste contexto, o objetivo deste estudo é investigar o potencial neuroprotetor dos principais SCFAs produzidos pela microbiota intestinal (acetato, propionato e butirato) em modelos experimentais da DA. Culturas organotípicas de hipocampo de rato foram expostas a oligômeros do peptídeo β -amiloide (A β Os), um componente neurotóxico encontrado em cérebros de pacientes com DA, e tratadas com cada SCFA individualmente ou com a combinação dos três SCFAs por 24h. Foram analisadas a expressão da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (IBA-1) por imunofluorescência e a secreção de citocinas inflamatórias por ELISA. Camundongos *Swiss* foram tratados por duas semanas com uma mistura dos SCFAs na água do bebedouro e então injetados por via intracerebroventricular com os A β Os. Vinte e quatro horas depois foram submetidos a testes cognitivos e comportamentais para avaliar aprendizado, memória, comportamento ansioso e tipo-depressivo. Camundongos *Swiss* também foram tratados por 2 semanas com antibióticos para depleção da microbiota intestinal, seguido por mais duas semanas de suplementação com SCFAs antes de receberem uma injeção de A β Os e passarem pelos testes comportamentais. Foi encontrado um aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no meio de cultivo da cultura organotípica após exposição aos A β Os e redução de todas as citocinas após tratamento com propionato e butirato. Imagens de imunofluorescência de fatias de cultura organotípica mostraram que o butirato foi capaz de reduzir o número de micróglia positivas para IBA-1. Testes cognitivos mostraram déficit de aprendizado e memória em animais injetados com os A β Os e recuperação parcial pelo tratamento com SCFAs. Testes comportamentais mostraram indução de comportamento do tipo-depressivo, mas não ansioso, pela injeção dos A β Os e recuperação parcial com tratamento por SCFAs, além de aparente aumento de apetite em animais tratados com SCFAs. Animais depletados de microbiota apresentaram déficit cognitivo, porém tiveram melhor desempenho de aprendizado quando injetados com os A β Os e quando tratados com SCFAs. Foi encontrado um aumento no nível de acetilação das histonas 3 e 4 em amostras do hipocampo de camundongos injetados com butirato intraperitonealmente, com pico de acetilação meia hora após a injeção. Ainda que mais experimentos sejam necessários, nossos dados sugerem um efeito neuroprotetor dos SCFAs.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

O PAPEL DE METABÓLITOS MICROBIANOS NO PROCESSO NEURODEGENERATIVO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ygor Parladore Silva

The intestinal microbiota has drawn great interest in biomedical research due to its influence on human physiology and pathologies. More recently, the concept of the microbiota-gut-brain axis was created as a two-way communication pathway. Among the various communication mechanisms between the microbiota and the brain, the activity of short-chain fatty acids (SCFA) has stood out due to its numerous effects on brain physiology and several diseases, such as Alzheimer's disease (AD). AD is the biggest cause of dementia worldwide and its impact tends to increase with the aging of the world population. Current therapies are only able to limit the progression of the disease and there is an active search for ways of diagnosis and prevention. In this context, the aim of this study is to investigate the neuroprotective potential of the main SCFAs produced by the intestinal microbiota (acetate, propionate and butyrate) in experimental models of AD. Organotypic cultures from rat hippocampus were exposed to β -amyloid oligomers (A β O) - a neurotoxic peptide found in the brains of AD patients - and treated individually or with a combination of the three SCFA for 24h. ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) immunofluorescence and inflammatory cytokine secretion were analyzed. *Swiss* mice were treated for two weeks with a mixture of SCFA in the drinking water and then injected intracerebroventricularly with the A β O. Twenty-four hours later they underwent cognitive and behavioral tests to assess learning, memory, anxious- and depressive-like behavior. *Swiss* mice were also treated for 2 weeks with antibiotics to deplete the gut microbiota, followed by another two weeks with SCFA before receiving an injection of A β O and undergoing behavioral testing. An increase in TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 was found in the medium of the organotypic culture after exposure to A β O and a reduction in all cytokines after treatment with propionate and butyrate. Immunofluorescence images of organotypic culture slices showed that butyrate was able to reduce the number of IBA-1 positive microglia. Cognitive tests showed learning and memory deficits in animals injected with A β O and partial recovery by treatment with SCFAs. Behavioral tests showed induction of depressive-like behavior, but not anxious, by injection of A β O and partial recovery with SCFA treatment, in addition to an apparent increase in appetite in animals treated with SCFA. Microbiota depleted animals showed cognitive impairment but had better learning performance when injected with A β O and when treated with SCFAs. An increase in the acetylation level of histones 3 and 4 was found in hippocampal samples from mice injected with butyrate intraperitoneally, with peak acetylation half an hour after injection. Although more experiments are needed, our data suggest a neuroprotective effect of SCFA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características e Funções da Microbiota Intestinal

A interação de um organismo multicelular com um microrganismo pode ter como desfecho a infecção, colonização transiente ou colonização permanente. A infecção é caracterizada pelo desenvolvimento de um processo patológico que gera dano ao organismo mediante instalação do patógeno, ao passo que a colonização não gera doença. Dessa forma, o conjunto de microrganismos que colonizam um hospedeiro sem lhe causar dano constituem sua microbiota (1,2).

Ao longo do desenvolvimento dessa área de pesquisa um grande desafio tem sido a padronização dos termos utilizados. As definições de “microbiota”, “metagenoma”, “microbioma” e outros ainda são tópicos de debate ativo, porém alguns autores já iniciaram tentativas de uniformização desses jargões (3,4). Dessa forma, neste documento adotamos como definições: (a) microbiota como conjunto de todos os microrganismos presentes em determinado ambiente, (b) metagenoma o conjunto de genomas provenientes da microbiota e (c) microbioma como o conjunto de todos os elementos de um ecossistema microscópico, incluindo procariotos, eucariotos inferiores, vírus e outros elementos genéticos livres e as condições ambientais do habitat em que se encontram (3,4). No entanto, ressaltamos que o conhecimento atual sobre a microbiota está majoritariamente concentrado na comunidade bacteriana, a qual é melhor caracterizada quando comparada à fúngica, protozoária e helmíntica (5,6). Dessa forma, o termo microbiota pode ser utilizado para se referir a comunidade bacteriana ou a todos os microrganismos.

Estima-se que o número de bactérias da microbiota, que cobre toda a superfície da pele e diversas cavidades mucosas, supera o de células humanas na proporção de 10:1 e que o microbioma contribui com pelo menos 300 vezes mais genes do que os humanos (1). Dos sítios anatômicos colonizados, o trato gastrointestinal é o mais estudado, pois apresenta maior diversidade e abundância de espécies procarióticas, contendo mais de mil espécies já isoladas e 70% de toda a biomassa da microbiota humana (1,6).

Evidências apontam para a existência de um microbioma central compartilhado pela maioria dos humanos, definido como um conjunto de espécies que habitam determinado sítio anatômico em 95% dos indivíduos. Devido à grande variabilidade interpessoal da microbiota, o número de espécies desse microbioma central é bastante reduzido, porém as espécies desse conjunto costumam concentrar a maior abundância, ao passo que o microbioma secundário concentra muitas espécies pouco abundantes (1). Nesse sentido, 90% da microbiota intestinal é composta pelos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, e *Bacteroidetes*, ao passo que *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* são filos recorrentes, mas presentes em baixa abundância (6). No entanto, diversos fatores determinam a formação da microbiota intestinal e sua contínua modificação ao longo da vida, como modo de parto e de alimentação infantil, idade, origem geográfica, composição da dieta, uso de medicação e exposição a estresse (5,7). Estas variáveis possibilitam diversas composições bacterianas entre indivíduos e em um mesmo indivíduo ao longo da vida que podem ser moduladas por esses fatores em maior ou menor grau, com impacto positivo ou negativo para a saúde (6,7).

A microbiota intestinal abriga mais de cem trilhões de bactérias que metabolizam produtos alimentares não digeridos e sintetizam diversos nutrientes, vitaminas, antígenos imunogênicos e moléculas bioativas (6–8). Conseqüentemente, essa é capaz de influenciar diversos processos fisiológicos e patológicos no metabolismo (9), na maturação do sistema nervoso central e periférico (10,11), na maturação e modulação do sistema imune (12), e proteção direta contra patógenos por competição (13), por exemplo. Portanto, é possível estabelecer para cada indivíduo um padrão composicional da microbiota em que esta é capaz de promover saúde ao hospedeiro por meio de suas funções fisiológicas, chamado eubiose (2,14).

Por outro lado, o desequilíbrio biótico ou disbiose é um quadro amplamente reconhecido por estar associado ao surgimento e progressão de diversas doenças, como doença inflamatória do intestino, obesidade e diabetes (9,15,16). No entanto, crescentes evidências indicam que alterações na microbiota intestinal também podem estar associadas a processos patológicos previamente não reconhecidos, como infecções virais (17,18), doenças cardiovasculares (19), doenças autoimunes (20) e doenças neurodegenerativas e comportamentais (21–23). Nesse contexto, nos últimos 15 anos temos testemunhado o reconhecimento da microbiota intestinal como um dos principais reguladores da atividade cerebral levando à formação do conceito do eixo microbiota-intestino-cérebro, o qual tem recebido cada vez mais destaque no campo de investigação das bases biológicas e fisiológicas do desenvolvimento neurológico, psiquiátrico e das alterações neurodegenerativas e associadas à idade. Entretanto, é importante ressaltar que

a compreensão sobre como a microbiota desempenha funções fundamentais sobre processos fisiológicos e patológicos apontados ainda é bastante limitada, porém mais limitado ainda é o conhecimento sobre seu papel na comunicação bidirecional entre o trato gastrointestinal (TGI) e o sistema nervoso central (SNC).

1.2. O Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro

A modulação da fisiologia intestinal pelo SNC já é amplamente conhecida, a exemplo do controle da motilidade, secreção, fluxo sanguíneo, nocicepção e ativação imune por estressores neurológicos (10,24,25). Além disso, esses mecanismos desencadeados pela sinalização neuronal são capazes de influenciar a homeostase da microbiota, principalmente por meio da ativação do sistema imune (26). Porém recentemente tem sido descritos casos de modulação da fisiologia cerebral a partir do intestino bem como a partir da microbiota intestinal, tornando esse eixo uma comunicação bidirecional (10,27–29). Ainda que seja necessário o estabelecimento de nexos causais mais convincentes (30), é notável como progressivamente mais evidências indicam que alterações na microbiota intestinal estão relacionadas a alterações no funcionamento cerebral, o que se reflete em pacientes afetados por doenças do SNC (31–35).

Apesar de ainda existirem controvérsias acerca de quando ocorre a primeira colonização microbiana, há poucas evidências de que possa de fato ocorrer colonização fetal *in utero* (36–38). É mais provável que a primeira colonização ocorra no momento do nascimento, visto que o modo de parto (vaginal ou cesariano) influencia muito mais a composição da microbiota intestinal no início da vida (6,7). Ainda assim, o microbioma intestinal materno durante a gestação parece ser determinante para o neurodesenvolvimento fetal. Em roedores, fetos gerados por mães livres de germes (GF - *germ-free*) e que mantém a condição GF após o nascimento apresentam baixa expressão da proteína de junção ocludina na barreira hematoencefálica (BHE) e, conseqüentemente, maior permeabilidade (39). Além disso, existem evidências de que fatores pré-natais como uso de antibióticos e probióticos (40,41), variações na dieta (42), infecções (43,44) ou exposição a estresse (45), os quais podem provocar alterações no neurodesenvolvimento e comportamento da prole, possuem efeitos dependentes de alterações no microbioma materno em humanos e em roedores (6,46).

A partir do nascimento diversos fatores ambientais além do modo de parto (47) como alimentação e eventos adversos no período pós-natal bem como infecções e tratamento com antibióticos (48,49), determinam a formação e a maturação da microbiota no início da vida, o que pode impactar o neurodesenvolvimento e o comportamento. É notável que apesar de fatores como modo de parto terem efeito sobre a composição microbiana limitado ao período pós-natal ou até primeira infância, os efeitos sobre o SNC mediados pela microbiota intestinal podem ser duradouros e determinantes para a manifestação de alterações cognitivas e comportamentais (10,50). Ainda assim, a microbiota intestinal continua suscetível a modificações ao longo da adolescência, as quais podem influenciar processos cerebrais, ficando progressivamente menos maleável até a fase adulta, quando se estabiliza e então volta a sofrer modificações no processo de envelhecimento (6,50). Esse processo está ilustrado na **Figura 1**

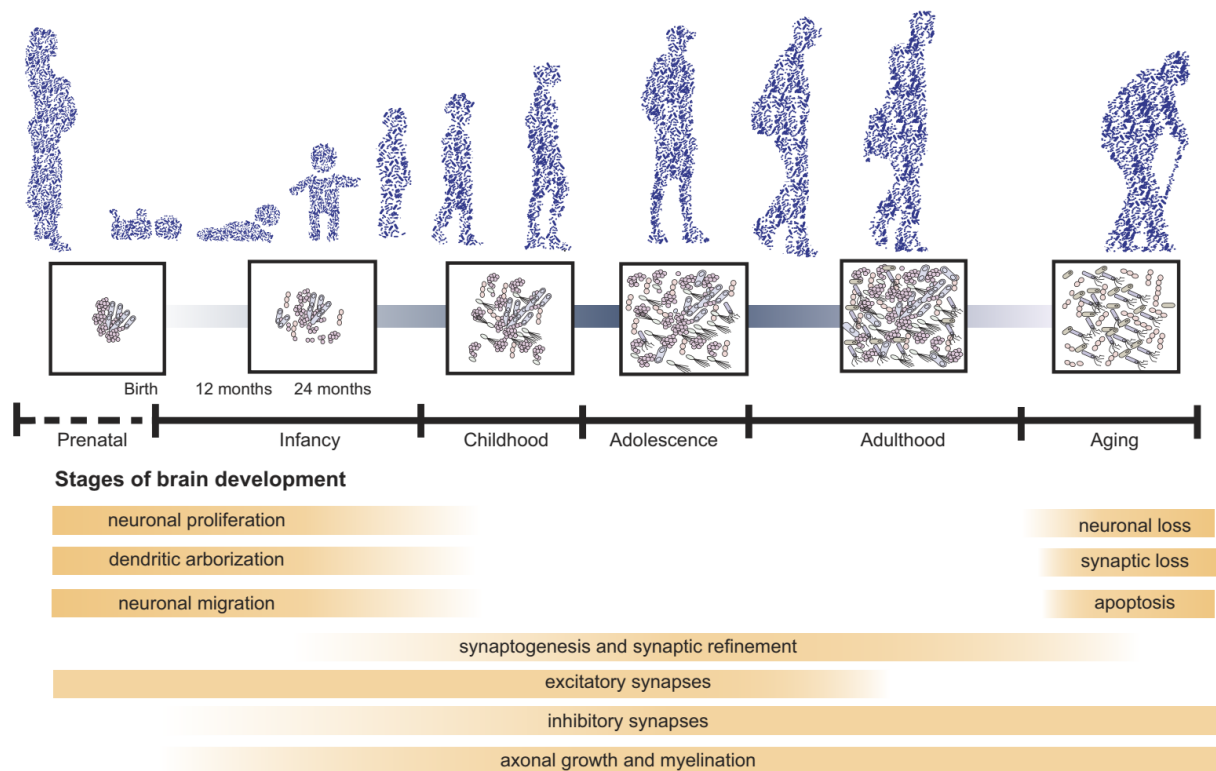


Figura 1: Modificações da microbiota ao longo da vida em associação a estágios de neurodesenvolvimento. Provavelmente no nascimento acontece a primeira colonização da pele e mucosas do bebê, a partir da qual a microbiota intestinal amadurece e passa por modificações ao longo da vida. Na infância, a microbiota intestinal da criança sofre grande influência da mãe, da forma de alimentação (aleitamento e introdução alimentar) e do ambiente de crescimento da criança, ao passo que essa microbiota também influencia aspectos da proliferação neuronal, arborização dendrítica, migração neuronal e gênese de sinapses excitatórias. Ao longo da adolescência, a microbiota é influenciada pela flutuação de hormônios e amadurecimento sexual e do corpo, o que se associa à fase de intensa sinaptogênese, refinamento sináptico, crescimento axonal e mielinização que ocorre no SNC. Na vida adulta, a microbiota se torna muito estável e resiliente, podendo sofrer modificações pela dieta, uso de medicamentos e exposições ambientais, porém mantendo majoritariamente uma microbiota central que raramente é substituída. Nessa fase da vida, ainda pode ocorrer sinaptogênese e refinamento sináptico principalmente de sinapses inibitórias. No envelhecimento, a microbiota se torna novamente instável, podendo apresentar uma perda significativa de diversidade e possivelmente influenciando os processos de perda neuronal e sináptica que ocorrem no SNC. Fonte: John F. Cryan et al. *Physiol Rev* 99: 1877-2013, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>>

Existem muitas vias em potencial para a sinalização entre microbiota e cérebro, entretanto estamos apenas começando a entender os mecanismos por trás dessa comunicação. O sistema nervoso entérico (SNE), o qual é composto por neurônios entéricos e células gliais entéricas que fazem parte do sistema nervoso autônomo e se comunicam com o gânglios simpáticos e parassimpáticos, é capaz de responder a estímulos diretos e indiretos da microbiota intestinal, além de modular as populações microbianas por meio de funções intestinais como motilidade e secreção (11,51). Entretanto, a microbiota é fundamental para a formação do SNE, como evidenciado com animais GF que apresentam reduzida inervação no cólon e maturação de da glia entérica (52,53). Há ainda as fibras do nervo vago que inervam a maior parte do intestino e carregam sinais diretamente do cérebro para as vísceras e vice-versa (6). Devido à grande variedade de receptores nos aferentes vagais, diversos sinais provenientes da microbiota podem ser detectados e influenciar diretamente no apetite, na inflamação intestinal e em comportamentos relacionados ao aprendizado e ao humor (54,55).

A comunicação da microbiota com o cérebro também pode ter como intermediário o sistema imune. O TGI abriga a maior população de células do sistema imune em todo o corpo, as quais precisam constantemente regular o nível de ativação e inflamação para que haja manutenção da população microbiana no lúmen sem que ocorra dano ao epitélio intestinal (10). Fisiologicamente, restos celulares, antígenos e produtos da microbiota intestinal são capazes de modular a hematopoiese de células do sistema imune inato (56) e a diferenciação de linfócitos tanto para um perfil inflamatório, como linfócitos T auxiliares 17 (Th17 - *T helper* 17) (57,58), quanto um perfil regulatório (59,60). Evidências indicam que essas células desempenham papéis relevantes na modulação do humor e progressão de doenças do SNC (61,62), porém ainda é necessário estabelecer a modulação do sistema imune como via de sinalização da microbiota com o cérebro nesses casos. Além disso, em situações de patologia em que há translocação microbiana ou endotoxemia (quadro inflamatório sistêmico de baixo grau e prolongado), o aumento da inflamação sistêmica exerce impacto negativo no funcionamento cerebral (63). Ainda, estudos recentes mostram que a microbiota intestinal é um componente fundamental para a maturação da microglia, célula fagocítica glial residente do SNC, e que os produtos microbianos são capazes de modular a fisiologia microglial (64).

Outra via pela qual a microbiota influencia o funcionamento cerebral, com notável influência sobre o comportamento é pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), responsável pela produção de glicocorticoides e regulação da resposta ao estresse (65,66). Animais GF ou tratados com antibióticos apresentam disfunção nesse eixo neuroendócrino que resulta na produção exagerada de corticosterona e consequente déficits sociais (67). Bactérias específicas da microbiota intestinal são capazes de regular o funcionamento desse eixo influenciando a produção de cortisol e a resposta ao estresse (65,68).

Todas essas vias de comunicação entre microbiota intestinal e cérebro ocorrem em parte como resposta a restos celulares, produtos microbianos secretados ou modulação da secreção de moléculas endógenas. Diversas espécies de bactérias da microbiota intestinal são capazes de influenciar a síntese ou até mesmo produzir e secretar neurotransmissores (32). Por exemplo, espécies dos filos *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* e *Escherichia* são produtoras de ácido γ -aminobutírico (GABA - *γ -aminobutyric acid*) (69,70). A microbiota também exerce grande influência sobre o metabolismo de triptofano e síntese de serotonina intestinal (29,71), a qual apesar de ser muito consumida na própria neurotransmissão intestinal está associada aos níveis de serotonina cerebrais (72). A microbiota também influencia o metabolismo, apetite e alimentação modulando a produção e secreção dos hormônios peptídeo YY (PYY) e peptídeo

semelhante a glucagon 1 (GLP-1 - *Glucagon-like peptide 1*) por células enteroendócrinas e de insulina pelo pâncreas (9,16,32).

Por fim, diversos subprodutos metabólicos da microbiota intestinal possuem atividade biológica, dentre os quais os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs - *short-chain fatty acids*) tem se mostrado como prováveis mediadores da comunicação intestino-cérebro. Além disso, esses metabólitos já foram encontrados alterados em pacientes afetados por diversas neuropatologias e sua administração ou a administração de bactérias produtoras de SCFAs representam abordagens terapêuticas promissoras (28,73).

1.3. Metabolismo e transporte dos SCFAs

Os SCFAs são pequenas moléculas orgânicas de cadeia saturada de até 6 átomos de carbono com um único grupamento carboxílico e são os principais produtos da fermentação anaeróbica de fibras e polissacarídeos não-digeridos da dieta no cólon (63). Composto majoritariamente por acetato (C2), propionato (C3) e butirato (C4), aproximadamente 500-600 mmol de SCFAs na proporção de 60:20:20, respectivamente, são produzidos diariamente no cólon dependendo do conteúdo de fibra na dieta, composição da microbiota e tempo de trânsito intestinal (74–76). Outros metabólitos produzidos pela microbiota incluem formiato (C1), isobutirato, valerato, isovalerato (C5), caproato e isocaproato (C6) (76). Ainda que a principal forma de produção de SCFAs seja pela fermentação de fibras, parte desses produtos são gerados no metabolismo de aminoácidos (77). No entanto, a formação de SCFAs por fermentação de proteínas fica restrita à porção distal do cólon, na qual os carboidratos já foram esgotados, sendo utilizada por menos de 1% das bactérias da microbiota intestinal (78). Essa via de metabolismo também acaba gerando outros metabólitos potencialmente tóxicos, como amônia, fenóis, sulfetos e ácidos graxos de cadeia ramificada, os quais já foram associados com surgimento de doenças inflamatórias do intestino (IBD - *inflammatory bowel diseases*) (79). Além dessas vias, bactérias da microbiota também podem utilizar o acetil-CoA proveniente da glicólise para síntese de butirato por meio da enzima butiril-CoA:acetil-CoA transferase (80,81).

Após sua produção, os SCFAs são rapidamente absorvidos por colonócitos via transportadores de monocarboxilato, os quais podem ser hidrogênio-dependente (MCT1 - *monocarboxylate transporter 1*) ou sódio-dependente (SMCT1 - *sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*) (82,83). Parte dos SCFAs absorvidos, majoritariamente o butirato, é metabolizado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA - *Tricarboxylic acid cycle*) por colonócitos (84,85). A outra parte se difunde para a veia porta hepática, aproximadamente 260 μM de acetato, 30 μM de propionato e 30 μM de butirato (86), que podem ser absorvidos e utilizados por hepatócitos (85), o que pode ser visto na **Figura 2**. Conseqüentemente, apenas uma pequena fração dos metabólitos produzidos pela microbiota chega à circulação, sendo a concentração aproximada no sangue 22,0-40,0 μM de acetato (87), 0-2,1 μM de propionato (88), 0,3-1,5 μM de butirato (89). No entanto, ainda há poucos trabalhos explorando a concentração sérica de SCFAs e como intervenções terapêuticas influenciam nessa translocação de moléculas, sendo muito mais comum trabalhos que utilizam a concentração fecal como representante da produção intestinal, principalmente em estudos com humanos por conta da facilidade de coleta e baixa invasividade (6,10,63). Neste contexto, é importante ressaltar que, ainda que a quantificação no conteúdo fecal seja uma abordagem válida, ela inclui muitos vieses em potencial, os quais precisam ser considerados para a obtenção de conclusões válidas e translação para a clínica (84,90).

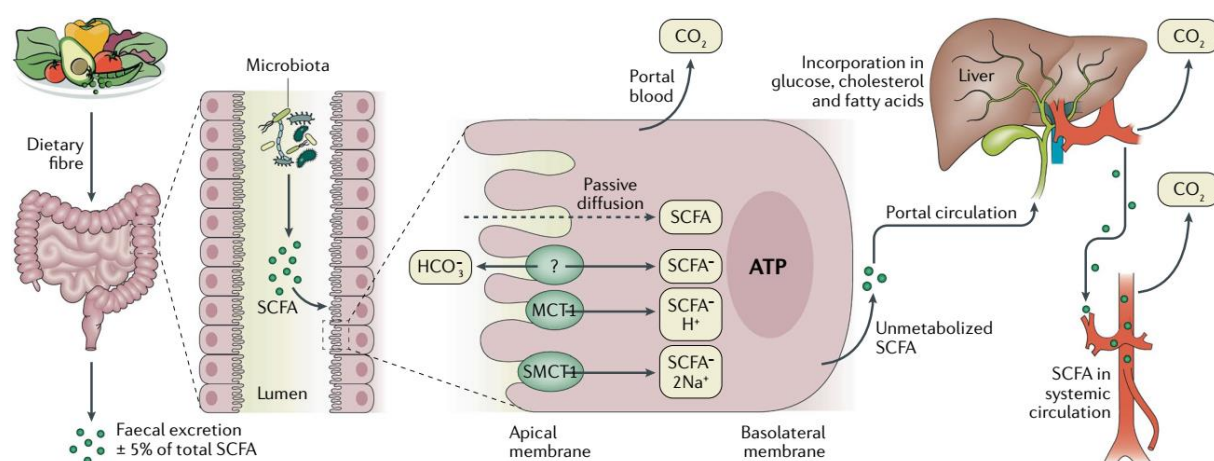


Figura 2: Fonte de síntese, absorção e transporte dos SCFAs da dieta. A principal fonte de SCFAs vem da fermentação anaeróbica de fibras alimentares por bactérias do cólon. Até 95% desses metabólitos são absorvidos por colonócitos via difusão passiva ou via transportadores de monocarboxilato dependentes de hidrogênio (MCT) ou de sódio (SMCT). Os SCFAs que não são metabolizados por colonócitos como substrato energético são transportados para o fígado via veia porta, onde sofrem outro processamento. Apenas uma fração dos SCFAs sobra do metabolismo hepático e chega a circulação sanguínea. Fonte: Dalile B, et al. *Nat Rev*

Pela circulação sanguínea, SCFAs são capazes de chegar ao cérebro cruzando a BHE, como já foi demonstrado em ratos pela injeção de ^{14}C -SCFAs na artéria carótida e detecção no cérebro (91), provavelmente devido a abundância de MCT expressos em células endoteliais (92). Ainda que haja escassez de dados sobre a concentração desses metabólitos no SNC, os três já foram detectados fisiologicamente no líquido cefalorraquidiano (LCR) de humanos a 22,0-171,0 μM de acetato (87), 0,0-6,0 μM de propionato (88), 0,0-4,2 μM de butirato (89). No tecido cerebral humano, foram encontrados em média 18,8 pmol/mg de propionato e 17,0 pmol/mg de butirato por cromatografia gasosa (93). Além disso, a concentração de SCFAs no cérebro pode ser modulada por meio de intervenções terapêuticas, como demonstrado em camundongos suplementados com *Clostridium butyricum* que apresentaram um aumento no nível de butirato em uma ordem de magnitude (94). Vários outros estudos em animais e em humanos aplicando prebióticos, probióticos e regime de dietas ricas em fibras já demonstraram efeitos neurológicos positivos dessas terapias, ainda que apenas poucos tenham quantificado os níveis de SCFAs (28).

1.4. Efeitos periféricos/ Mecanismos dos SCFAs

Ainda que não sejam completamente compreendidas as vias de sinalização desencadeadas pelos SCFAs em cada caso particular, são conhecidos pelo menos dois mecanismos pelos quais esses metabólitos atuam, ilustrados na **Figura 3**: ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCR – *G protein-coupled receptors*) e inibição de histona-desacetilases (HDAC). Os GPCR ativados por SCFAs mais estudados são GPR43 e GPR41, posteriormente renomeados de receptores de ácidos graxos livres 2 e 3 (FFAR2 e FFAR3 - *Free fatty acid receptor 2 and 3*), respectivamente. Ambos receptores são expressos no cólon, em diversas células imunes e no SNC; entretanto, adipócitos e músculo esquelético expressam apenas FFAR2 e o sistema nervoso periférico (SNP) e a BHE expressam apenas FFAR3 (95–97). Outros receptores incluem receptor de ácidos hidrocarboxílicos (-GPR109a/HCAR2 - *hydrocarboxylic acid receptor 2*), receptor olfatório da família 51 subfamília E membro 1 (GPR164/OR51E1), expressos principalmente em colonócitos, adipócitos e células imunes,

porém são seletivos para butirato (98,99). Já o receptor OR51E2 é específico para propionato e acetato e é expresso em neurônios do sistema nervoso autônomo (100).

Os SCFAs também são capazes de modular a expressão gênica por meio da inibição da acetilação de histonas. A expressão gênica é regulada, dentre outros mecanismos, pela compactação da cromatina ao redor das histonas, a qual é modulada principalmente pela acetilação, de forma que histonas acetiladas tornam a cromatina mais disponível para transcrição e a remoção de grupos acetil torna a cromatina mais compacta e silenciada (28,101). Todos os SCFAs apresentam algum grau de modulação da acetilação de histonas, sendo butirato e propionato potentes inibidores da HDAC, enquanto acetato apresenta baixa atividade de inibição de HDAC porém induz a ativação de histona-acetiltransferases (HAT) (6,102).

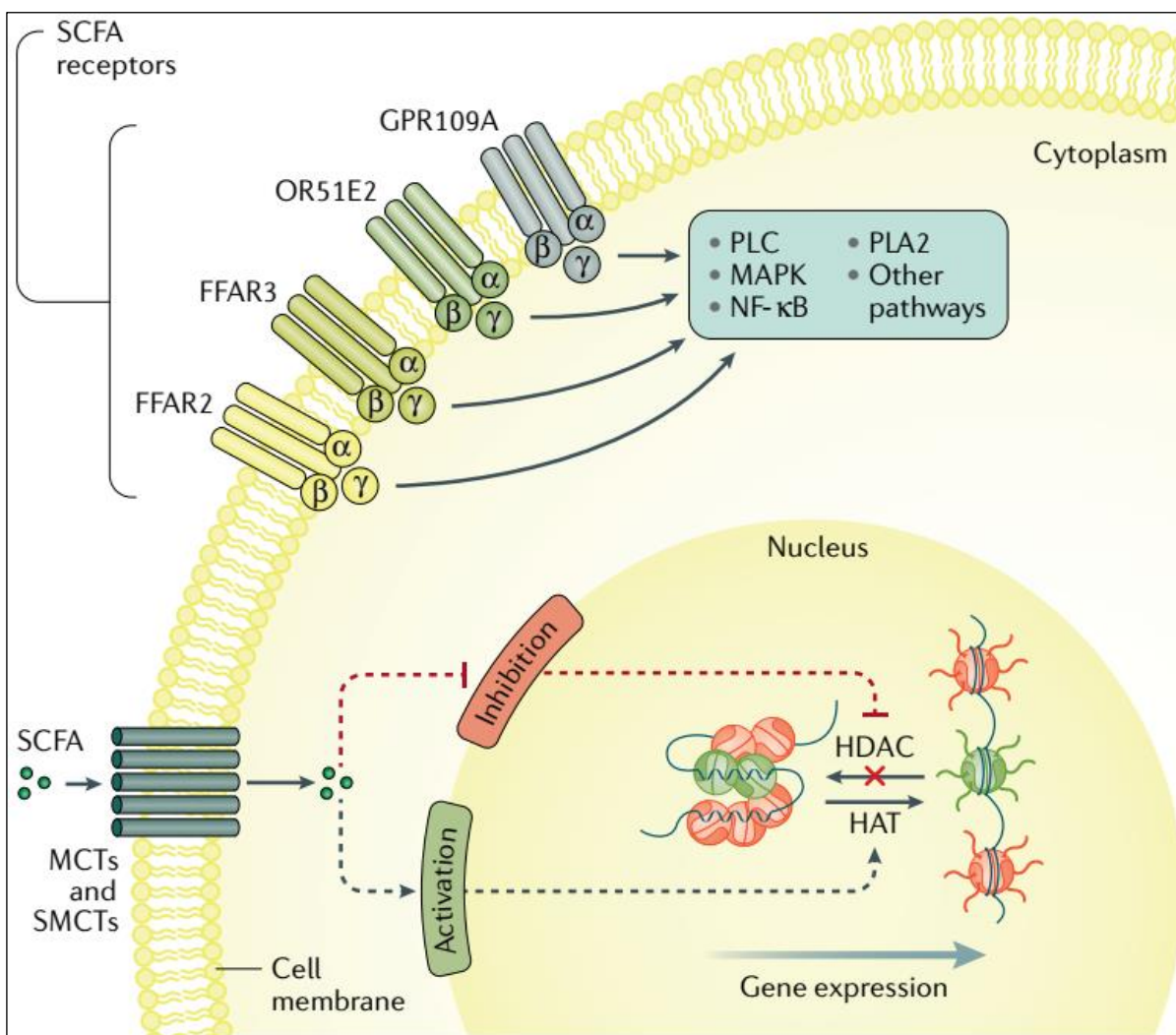


Figura 3: Mecanismos de sinalização celular dos SCFAs. São conhecidos dois mecanismos de sinalização celular principais por SCFAs: via GPCR e via modulação de acetilação de histonas. Os SCFAs podem se ligar com diferentes graus de afinidade aos receptores FFAR2, FFAR3, OR51E2 e GPR109A, os quais desencadeiam diversas cascatas de sinalização que modulam o funcionamento celular. Alternativamente, eles podem ser transportados para dentro da célula através de MCT e SMCT e inibir histona desacetilases ou ativar histona acetil transferases, modulando a expressão gênica. Fonte: Dalile B, et al. *Nat Rev Gastroenterol and Hepatol*, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>>

1.5. Efeitos dos SCFAs sobre o SNC

Por meio dos dois principais mecanismos descritos, os SCFAs são capazes de influenciar direta ou indiretamente o funcionamento cerebral, como ilustrado na **Figura 4**. Os efeitos dos SCFAs sobre o SNC podem ser via modulação do sistema imune ou do nervo vago, alterações na secreção de hormônio e peptídeos intestinais, secreção de insulina e interleucinas, produção de neurotransmissores bem como via ação direta sobre as células da BHE e do SNC. Parte da modulação do sistema imune pela microbiota intestinal parece ocorrer por meio dos SCFAs. Primeiramente, esses metabólitos influenciam diretamente a função de barreira de enterócitos, modulando a secreção de muco e expressão de junções oclusivas, conseqüentemente influenciando a translocação microbiana e exposição de células imunes a antígenos (103). Adicionalmente, já é reconhecido que neutrófilos, células dendríticas, monócitos, macrófagos e células T respondem a inibidores de HDAC e possuem um ou mais receptores para SCFAs, principalmente FFAR2 e FFAR3, mas também GPR109a, de forma que esses metabólitos microbianos modulam e mantêm a homeostase do sistema imune (28). De fato, em neutrófilos os SCFAs exercem papel quimioatraente, aumentando a expressão de CXCL1 e CXCL8, ao mesmo tempo que reduzem a produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ligada à fagocitose (104).

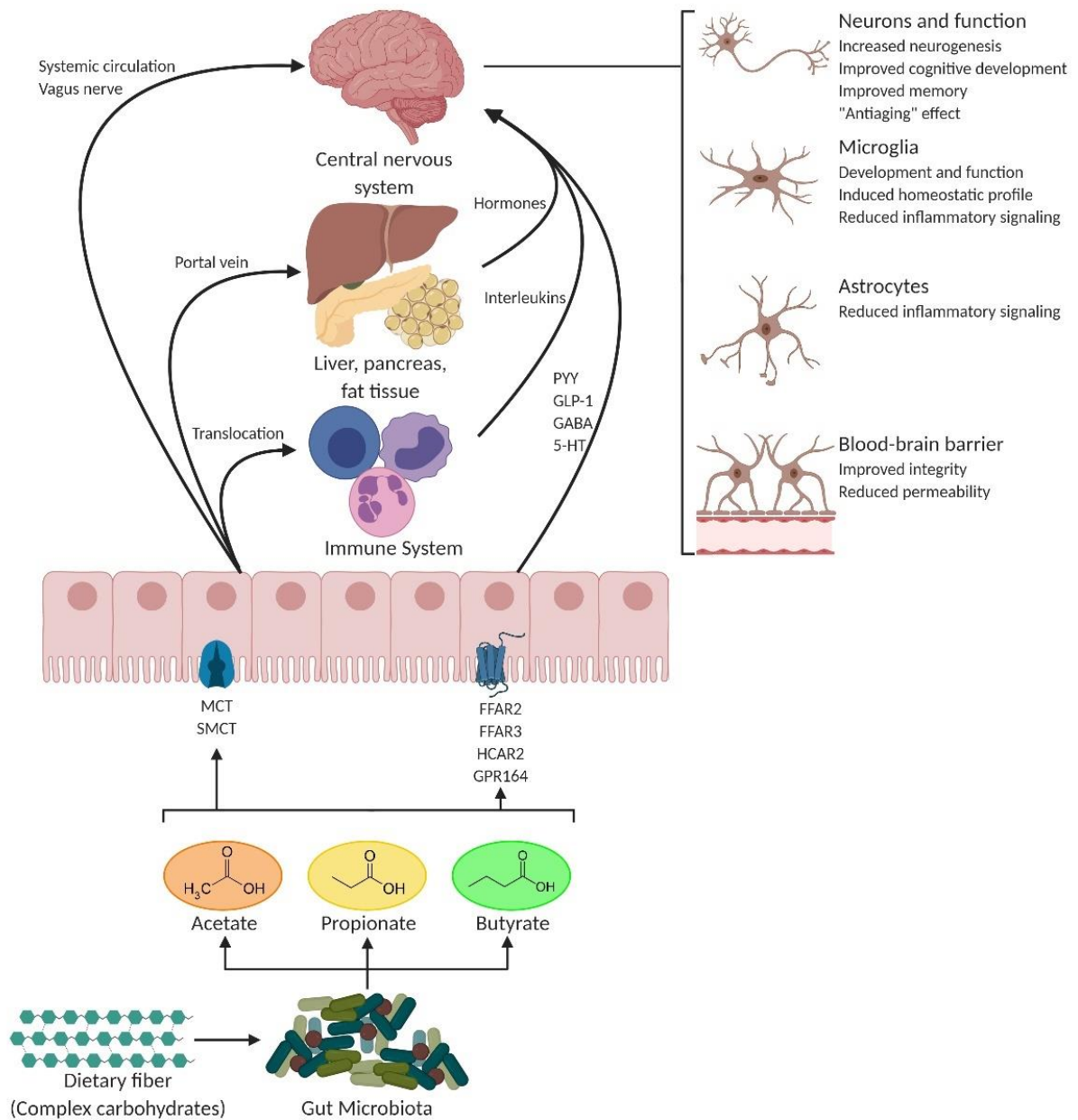


Figura 4: Potenciais vias de comunicação dos SCFAs no eixo microbiota-intestino-cérebro (MIC). Ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) são os principais metabólitos produzidos pela microbiota a partir da fermentação anaeróbica de fibras da dieta e polissacarídeos resistentes. Após sua produção, SCFAs são absorvidos por colonócitos via transportadores de monocarboxilato dependente de hidrogênio (MCT) ou dependente de sódio (SMCT). Esses metabólitos atuam por meio da ligação a receptores acoplados a proteína G (GPCR), tais como receptor de ácidos graxos livres 2 e 3 (FFAR2 e FFAR3), receptor de ácidos hidrocarboxílicos 2 (HCAR2) e GPR164, e por meio da inibição de histona desacetilases (HDAC). Por esses mecanismos, influenciam a imunidade de mucosa e a função de barreira do intestino, induzem a produção dos hormônios intestinais peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo

YY (PYY) pelas células enteroendócrinas, assim como a produção de ácido γ -aminobutírico (GABA) e serotonina (5-HT), os quais podem sinalizar para o cérebro pela circulação sanguínea ou por terminações vagais. Os SCFAs derivados do cólon influenciam células do sistema imune local e circulantes levando à diferenciação de linfócitos T, monócitos e neutrófilos alterando o perfil de citocinas circulantes e de células que chegam ao cérebro. Esses metabólitos atingem a circulação por meio da veia porta hepática e chegam a outros tecidos, levando à ativação do tecido adiposo marrom, regulação da função mitocondrial do fígado, aumento da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas e modulação da homeostase energética de corpo inteiro. Os SCFAs também podem chegar ao cérebro atravessando a barreira hematoencefálica (BHE) por meio de transportadores expressos em células endoteliais ou afetar o cérebro por meio do nervo vago. No sistema nervoso central podem influenciar a integridade da BHE aumentando a expressão de proteínas de junção oclusiva, a neuroinflamação pela maturação e função de microglia e astrócitos e a homeostase neuronal por meio do aumento na produção de fatores tróficos, da neurogênese e da síntese de neurotransmissores. Dessa forma, interações dos SCFAs no eixo MIC podem direta e indiretamente afetar aspectos emotivos, cognitivos e fisiopatológicos. Fonte: Y. P. Silva, A. Bernardi, R. L. Frozza (2020). Disponível em <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>

Além disso, esses metabólitos modulam a atividade de monócitos, macrófagos e células dendríticas limitando sua proliferação e produção de citocinas inflamatórias, podendo reduzir a atividade fagocítica e apresentação de antígenos em alguns casos (103). Por fim, os SCFAs são capazes de modular a diferenciação de linfócitos T em modelos murinos para um perfil regulador, com aumento na expressão de FOXP3 e secreção de IL-10, porém *in vitro* são capazes de potenciar a diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 já estimulados. Isso aponta para um papel duplo dos SCFAs na modulação dessas células, porém mesmo em modelos de infecção e inflamação intestinal os metabólitos parecem resultar em controle da inflamação e melhor desfecho da doença (103).

Por meio de receptores FFAR2, FFAR3, OR51E1 e OR51E2 os SCFAs são capazes de estimular células enteroendócrinas a secretarem GLP-1 e PYY (105,106), os quais afetam circuitos cerebrais importantes na regulação do apetite e ingestão alimentar via circulação sistêmica ou aferentes vagais (28). Esses metabólitos também estimulam a secreção de leptina por adipócitos, induzindo a ativação de vias anorexigênicas no hipotálamo (107), e inibem a secreção de grelina por células produtoras do estômago e duodeno, principal hormônio orexigênico e associado à resposta antecipatória a alimentos calóricos (108), portanto reduzindo

a fome e regulando o comportamento alimentar. Além disso, a sinalização em células β -pancreáticas aumenta a secreção de insulina, o que também contribui para a regulação metabólica e do comportamento (106).

Concomitantemente, o sistema nervoso entérico e o nervo vago são modulados pelos SCFAs e desencadeiam respostas centrais no sistema nervoso (28). De fato, neurônios do sistema nervoso entérico, da veia porta e do gânglio nodoso expressam FFAR3, o que possibilita efeitos diretos dos SCFAs (95). Apesar de estes não serem completamente conhecidos, injeções de butirato no jejuno geram descargas neurais nos aferentes vagais que são abolidas após vagotomia (55). Além disso, efeitos positivos no humor e nos níveis de neurotransmissores induzidos pelo tratamento com *Bifidobacterium longum* NCC3001 são perdidos após a danificação do nervo vago (109).

Além da modulação de diversos sistemas periféricos gerando respostas centrais, é importante destacar os efeitos dos SCFAs se estendem diretamente aos neurônios do SNC, como observado mediante tratamentos com prebióticos e probióticos (63). Dos três principais SCFAs, aquele que chega ao cérebro em maior concentração é o acetato, o qual foi detectado no hipotálamo desencadeando ativação neuronal, aumento dos níveis de glutamato, GABA e de neuropeptídeos anorexigênicos, resultando na supressão do apetite (110). Ainda assim, propionato e butirato são capazes de regular no cérebro a expressão de triptofano 5-hidroxilase 1, enzima envolvida na síntese de serotonina, e tirosina hidroxilase, essencial na síntese de dopamina, influenciando então a bioquímica cerebral (111). Ademais a depleção da microbiota de camundongos por meio do uso de antibióticos resulta em prejuízos na neurogênese hipocampal e na memória, o que está associado a uma drástica redução na produção de SCFAs e pode ser revertido por tratamento com probióticos (112). Além de neurotransmissores, os níveis dos SCFAs também estão associados a níveis de fatores neurotróficos como fator de crescimento de neurônios (NGF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (113,114). Nesse contexto, uma série de estudos demonstrou que o butirato de sódio aumenta a expressão de BDNF, a neurogênese e proliferação neural em roedores, potencialmente pelo efeito de inibição de HDAC (115–117).

A formação, desenvolvimento e plasticidade do SNC ocorre sob o controle de células da glia, as quais atuam podando e reorganizando circuitos neurais, um papel crítico para processos cognitivos, emocionais e sociais (118). A microglia é crucial no processo de refinamento sináptico, limpeza e defesa do SNC, por ser um macrófago residente do tecido (119). Interessantemente, a microbiota é essencial no desenvolvimento e regulação da atividade microglial, a qual parece atuar por meio dos SCFAs, uma vez que camundongos GF apresentam células microgliais de perfil imaturo que podem ser parcialmente recuperadas pela suplementação com acetato, propionato e butirato (96). Erny e colaboradores demonstraram elegantemente que os efeitos dos SCFAs sobre a maturação da microglia provavelmente são mediados via FFAR2, visto que animais deficientes nesse receptor não recuperaram a maturação microglial, porém novos estudos indicam que o efeito dos SCFAs sobre a microglia também pode ocorrer por inibição de HDAC (120).

A neuroinflamação também tem forte impacto sobre o comportamento e formação de circuitos cerebrais. Uma vez que a microbiota influencia a maturação e funcionalidade do sistema imune, inclusive da microglia no SNC, perturbações da microbiota como o uso prolongado de antibióticos causa alterações na resposta imune, em geral tendendo a um perfil mais inflamatório (96,121). Nesse sentido, perturbações sobre a microbiota induzidas por antibióticos agravam a neuroinflamação em modelos murinos de doença de Alzheimer (122,123), porém o tratamento com butirato em modelos de inflamação aguda reduzem o perfil inflamatório da microglia, reduzindo a produção de citocinas e induzindo modificações morfológicas (120,124). Similarmente, o tratamento com acetato de culturas primárias tanto de microglia quanto de astrócitos foi capaz de reduzir vias de sinalização pró-inflamatórias e a expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (125,126). O principal mecanismo efetor encontrado até o momento foi a inibição de HDAC, porém a sinalização precisa por SCFAs ainda não é completamente conhecida.

1.6. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) representa 60 a 70% dos casos de demência afetando uma grande parcela da população, dado que atualmente mais de 50 milhões de pessoas vivem com demência no mundo (127). Estima-se que o número de casos pode dobrar a cada 20 anos e mais de 60% dos casos são encontrados em países de baixa e média renda (128). No Brasil, estima-se que haja cerca de 1,2 milhão de pessoas vivendo com DA, um número que cresce rapidamente devido a transição demográfica pela qual o país atravessa (129). A maioria dos casos acomete pessoas de mais de 65 anos, considerado DA de incidência tardia, enquanto apenas 5% dos casos acomete pacientes com idade inferior aos 65 anos, designado DA de origem familiar (130). Ao passo que a demência é caracterizada intra-individualmente pelo prejuízo cognitivo progressivo e perda de autonomia para tarefas diárias, a DA é definida biologicamente pela deposição extracelular de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) formando placas neuríticas e pela presença de emaranhados neurofibrilares (NFT - *neurofibrillary tangles*) formados por agregados de proteína tau hiperfosforilada (p-tau) no interior de neuritos distróficos (130). A fisiopatologia básica da doença por esses dois marcadores está ilustrada na **Figura 5**.

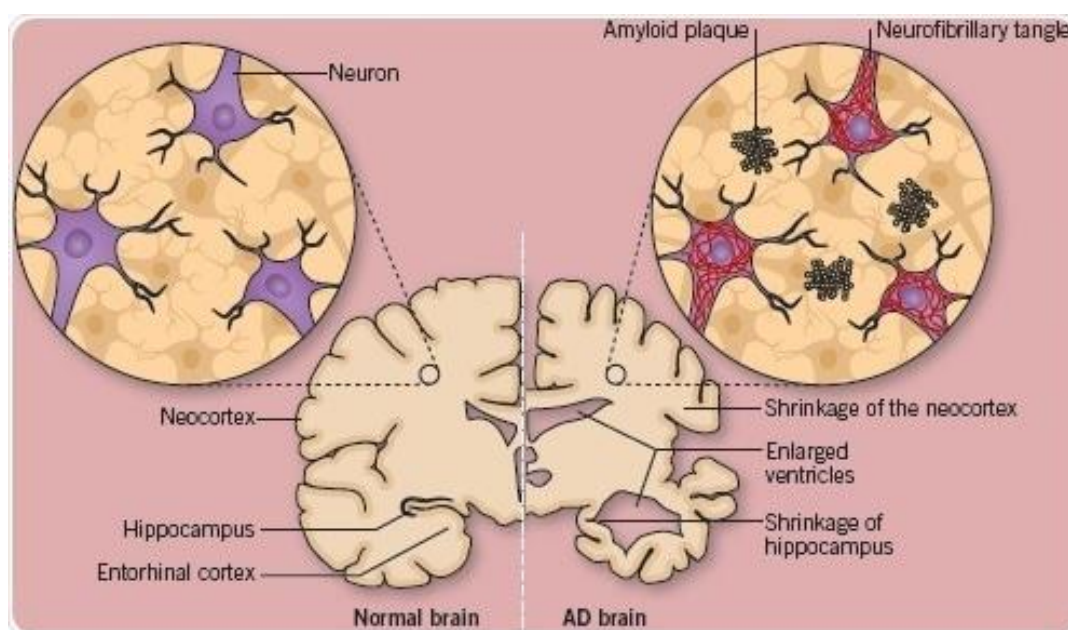


Figura 5: Fisiopatologia da Doença de Alzheimer pela formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares. No cérebro com DA avançada são encontradas placas de peptídeo β -amiloide extracelulares e emaranhados neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada intracelulares. Ambas as proteínas são neurotóxicas e pró-inflamatórias, promovendo a morte neuronal que resulta na perda de funções cognitivas e mnemônicas, redução da massa cerebral e aumento dos ventrículos. Fonte: News Medical: Examining Neurobiology and Drug Targets in Alzheimer’s Disease. Disponível em <<https://www.news-medical.net/whitepaper/20190318/Examining-Drug-Targets-and-Neurobiology-in-Alzheimers-Disease.aspx?showform=cookiesettings>>

Uma série de evidências indica que a formação de placas neuríticas é um dos principais mecanismos que desencadeiam os fenômenos biológicos da DA, o que levou ao surgimento da hipótese amiloide. Essas placas são majoritariamente compostas por peptídeos de 42 e 40 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$ e $A\beta_{1-40}$), gerados a partir da proteína precursora de amiloide (APP – *amyloid precursor protein*) via clivagem proteolítica sequencial por β -secretase e pelo complexo γ -secretase (presenilina 1 e 2), liberando o $A\beta$ para o espaço extracelular (131). A partir de sua liberação, os peptídeos de $A\beta$ são propensos a estruturar-se em folhas β -pregueadas. O processo de agregação leva à formação de oligômeros ($A\beta O$) solúveis, bem como a formação de protofibrilas e fibrilas, a qual ocorre por um processo de nucleação primária entre monômeros formando o esqueleto da fibrila, seguida por alongamento da fibrila, com agregação de novos monômeros, ou nucleação secundária, com agregação de novas fibrilas já nucleadas (132). No estado avançado da doença são encontradas placas insolúveis de $A\beta$, porém todos os estados biofísicos citados são neurotóxicos e neuroinflamatórios (133–135).

A hipótese amiloide proposta por George Glenner (136) encontra evidências principalmente na ocorrência de formas hereditárias da doença, tanto dominantes no caso de DA familiar quanto não-dominantes no caso de DA esporádica, das quais são mais prevalentes mutações no processo de geração do peptídeo $A\beta$ (genes da APP e da presenilina 1 e 2) (137,138) e de depuração desse peptídeo (gene da APOE4) (139,140). Nesse contexto, modelos murinos de DA são gerados por meio de mutações que levam ao acúmulo de espécies agregadas de $A\beta$ (62) ou pela injeção de $A\beta O$ s por via intracerebroventricular (ICV) (133) e desencadeiam alterações cognitivas e comportamentais semelhantes àquelas observada em pacientes com DA.

Outro mecanismo patológico da DA é a formação de emaranhados neurofibrilares compostos de p-tau, no entanto não é completamente compreendido se este é o mecanismo iniciador ou o contrário, se o acúmulo de A β propicia a hiperfosforilação da tau. Sabe-se que a tau é primariamente expressa em neurônios do cérebro e desempenha uma função central na montagem e estabilização de microtúbulos e no transporte ao longo destes. A tau é alvo de diversas modificações pós-traducionais, dentre as quais a fosforilação, que na DA e em outras tauopatias ocorre de forma aberrante levando à agregação e fibrilação (130). A partir da fibrilação, a tau é translocada do compartimento axonal para o soma de neurônios, danificando então a função sináptica ao inibir o trânsito de receptores de glutamato e, posteriormente, podendo se propagar através de sinapses para outros neurônios conectados de forma semelhante à proteína príon (134). O acúmulo de p-tau leva a morte neuronal e a proteína é capaz de se propagar ao longo de regiões anatomicamente ligadas do SNC.

Ao passo que a forma familiar da DA apresenta determinantes genéticos para a ocorrência da doença, a forma esporádica é multifatorial (135). O maior fator genético de risco conhecido é a variante ϵ 4 do gene da apolipoproteína E (APOE4), que possui as três variantes comuns ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 (APOE2/3/4). Comparado a uma pessoa com alelos APOE3/E3, a presença de apenas um alelo de APOE4 aumenta o risco de uma pessoa desenvolver DA em 4 vezes, enquanto dois alelos aumentam em 12 vezes (136). No SNC, a expressão de APOE parece estar restrita majoritariamente a astrócitos e em menor grau à microglia, porém o conhecimento da influência de APOE sobre a fisiopatologia da DA ainda é limitado (137,138).

Além das alterações bioquímicas, há evidências de que o sistema imune está envolvido na progressão de doença neurodegenerativas, principalmente baseado em achados de que, além de APOE4, outros fatores genéticos de risco para DA são quase exclusivamente expressos em células do sistema imune, por exemplo TREM2 (*Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2*), CD33 (*Cluster of differentiation 33*), CR1 (Receptor de complemento 1), etc. (139). No entanto, ainda é pouco entendido o papel e o potencial terapêutico da microglia e dos astrócitos e menos ainda o papel das células do sistema imune periférico, como linfócitos e monócitos, os quais podem influenciar direta e indiretamente o funcionamento cerebral (140,141). Ainda assim, contribuições recentes para este campo mostraram que diferentes perfis de microglia são responsáveis por restringir ou agravar a progressão da DA (142) e que o perfil de microglia associado a doença também induz a diferenciação de astrócitos para um perfil pró-inflamatório (143). Além disso, com a descoberta e descrição do sistema linfático cerebral (144) novos esforços têm sido feitos para entendimento do papel de linfócitos na DA (58,145).

Métodos para o diagnóstico da DA estão sendo aprimorados continuamente e a busca por biomarcadores é uma área em franco crescimento. Há muito são usados testes clínicos padronizados que permitem determinar o grau de severidade dos sintomas de demência por meio de *scores* do comprometimento de diversos domínios do comportamento humano, porém já foi mostrado que os sintomas da DA aparecem já na fase avançada da doença, como ilustrado na **Figura 6**. Em contrapartida, atualmente é possível detectar marcadores da doença em fase muito mais precoce por meio da tomografia de emissão de pósitrons e da análise de LCR. Pela tomografia é possível detectar a deposição de A β , hipometabolismo cortical, acúmulo de tau e perda de volume cerebral. Por outro lado, os biomarcadores do LCR mais utilizados são a razão A β_{1-42} /A β_{1-40} e a cadeia leve de neurofilamento, porém espécies de p-tau tem se mostrado como marcadores promissores que podem ser detectados até mesmo no soro (130,146).

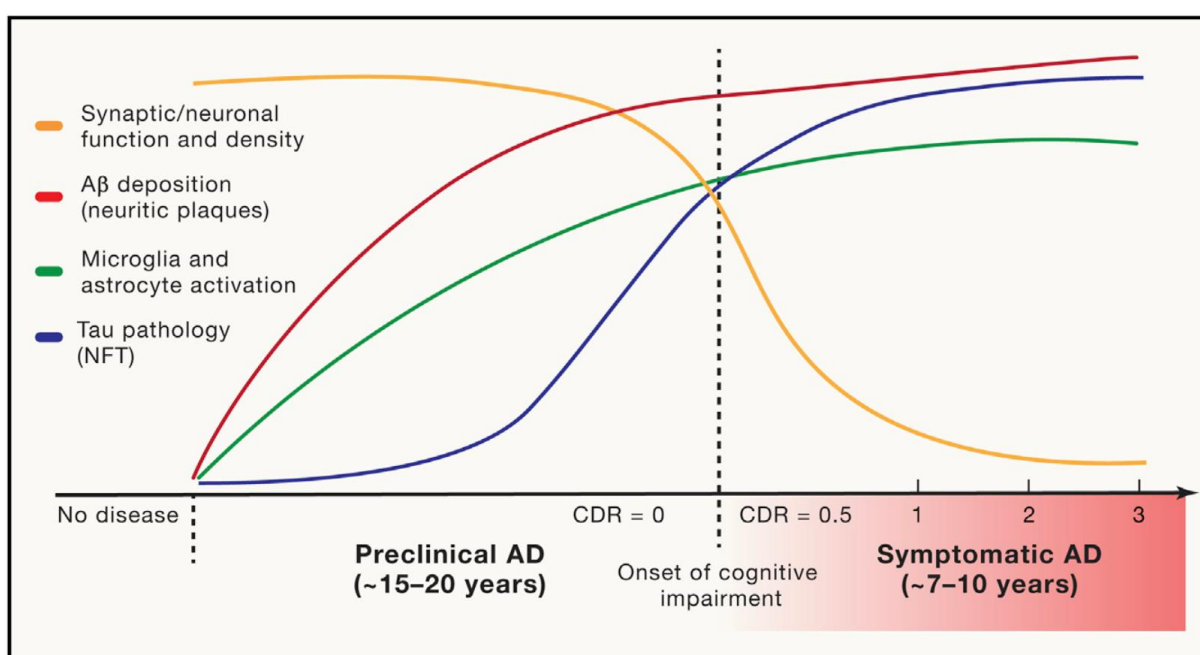


Figura 6: Progressão de biomarcadores presentes ao longo da patologia da Doença de Alzheimer. A DA pode ser dividida em uma fase pré-clínica e uma fase sintomática. Na primeira, acontece o acúmulo gradual das proteínas patogênicas da doença e de danos ao SNC, o qual pode se estender por décadas antes alcançar níveis detectáveis por exames disponíveis atualmente ou de dar início à fase sintomática. Nesta, os danos acumulados já são suficientes para prejudicar funções cognitivas e operacionais do paciente, o que geralmente resulta na busca por ajuda médica. Porém nessa fase o prognóstico já é de perda progressiva de funções cerebrais, a qual terapias atuais conseguem apenas retardar. Fonte: Long, J.M.; Holtzman D.M. *Cell*. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>>

Quanto ao tratamento, as terapias atuais são apenas capazes de reduzir o ritmo de progressão da doença, mas garantem benefícios limitados aos pacientes e não são capazes de reverter a perda cognitiva. O desenvolvimento de terapias contra a DA tem sido dificultada pela complexa fisiopatologia da doença, que representa um desafio na pesquisa de novas abordagens terapêuticas (147). Atualmente estão aprovados medicamentos inibidores da colinesterase e a memantina, um modulador não competitivo do receptor de NMDA, ambos voltados apenas para o tratamento sintomático (130). No entanto, mais recentemente foi aprovado pela FDA nos Estados Unidos o Aducanumab, um anticorpo monoclonal contra agregados de A β , portanto o primeiro fármaco modificador da doença (148). Além disso, foi aprovado na China o uso de um prebiótico intitulado GV-971 para o tratamento da DA, com resultados mostrando redução de scores clínicos da doença por meio de modulação da inflamação e da deposição de A β (149).

1.7. Influência da Microbiota Intestinal sobre a Doença de Alzheimer

Uma vez que a microbiota intestinal é capaz de modular o funcionamento do SNC por diversas vias, inclusive pela modulação do sistema imune, essa se tornou importante alvo de pesquisas na busca de potenciais alvos terapêuticos para doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, já foi identificado que pacientes de DA apresentam quadro de disbiose associado a doença e que perturbações na microbiota intestinal podem influenciar certos aspectos da patologia (150,151). Consistente com esses achados, Zhang e colaboradores demonstraram que camundongos transgênicos para DA também apresentam alterações na composição da microbiota e perda de diversidade, associadas à redução nos níveis de SCFAs (152).

Crescentes evidências apontam para o impacto da microbiota intestinal sobre a patogenia e patologia da DA. Primeiramente, foi demonstrado que tanto animais APP/PS1 criados sob condições GF (153) quanto os mesmos animais tratados no início da vida com antibióticos (122,123) apresentaram reduzido acúmulo cerebral de A β . Em contrapartida, o transplante de microbiota fecal de camundongos selvagens para camundongos APP/PS1, linhagem de camundongos transgênicos com mutações associadas ao desenvolvimento de DA, é capaz de resgatar déficits cognitivos desses animais em tarefas dependentes de memória espacial (154). Similarmente, o tratamento de animais 5xFAD, outra linhagem de camundongos transgênicos carregando um total de 5 mutações associadas à DA, com prebióticos também resultou em melhora da memória espacial associada à redução do acúmulo de A β e de p-tau

cerebral (155). Ambos os estudos mostraram que houve um aumento na produção de SCFAs associado às intervenções terapêuticas.

Nesse sentido, os SCFAs apresentam potencial efeito modulador da DA, uma vez que são capazes de induzir, em diferentes graus, a diferenciação de linfócitos T reguladores (T_{reg}) extra-tímicos (59,60), reduzir o perfil inflamatório e aumentar a capacidade fagocítica microglial (124) além de modular alterações de humor (156). Dessa forma, torna-se pertinente investigar a hipótese de que os SCFAs podem desempenhar funções neuroprotetoras em modelos experimentais da DA por meio da modulação da inflamação no SNC e modulação do sistema imune.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial neuroprotetor dos principais SCFAs produzidos pela microbiota intestinal (acetato, propionato e butirato) em modelos experimentais da doença de Alzheimer.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito dos SCFAs sobre a neuroinflamação induzida pelos A β Os em cultura organotípica de hipocampo;

Avaliar o efeito da suplementação com os SCFAs sobre alterações comportamentais induzidas pela injeção intracerebroventricular de A β Os;

Determinar o papel dos SCFAs sobre as alterações comportamentais induzidas pela depleção da microbiota bacteriana intestinal seguida pela administração intracerebroventricular de A β Os.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese e caracterização dos oligômeros de A β (A β Os)

Os oligômeros foram preparados a partir do A β ₁₋₄₂ (American Peptide, Sunnyvale, CA) como descrito por Lambert e colaboradores (157). O peptídeo foi solubilizado em 1 mM de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Merck, Darmstadt, DE) gelado e a solução límpida e incolor resultante foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos. A solução foi então colocada em gelo por 10 minutos e alíquotada, em fluxo laminar, em microtubos. Os microtubos foram deixados abertos na capela de fluxo laminar durante 12 horas para evaporação do HFIP. A eliminação completa do HFIP foi realizada por centrifugação em “SpeedVac” por 10 minutos. As alíquotas contendo os filmes de A β ₁₋₄₂, assim obtidos, foram estocadas a -20°C para utilização posterior.

As preparações de A β Os foram realizadas a partir destes estoques de filmes de A β ₁₋₄₂. A cada preparação de A β Os, uma alíquota (filme) de A β ₁₋₄₂ foi ressuspendida em dimetilsulfóxido anidro (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO) de forma a obter uma solução a 5 mM. Esta solução foi diluída a 100 μ M em tampão fosfato-salino (PBS) estéril e incubada a 4°C por 24 horas. Uma amostra de mesmo volume de DMSO 2% em PBS foi preparada e incubada a 4°C por 24 horas, e usada experimentalmente como controle (veículo). Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos a 4°C para remoção de agregados insolúveis de A β ₁₋₄₂. O sobrenadante da centrifugação, contendo A β Os, foi mantido a 4°C até a sua utilização em um período máximo de até 48 horas após o preparo. Para determinar a concentração de A β Os nas preparações, utilizou-se o método do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL) para dosagem de proteínas. As preparações de A β Os foram analisadas por cromatografia de gel-filtração para caracterizar as espécies oligoméricas presentes.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna de sílica SynChropak GPC 100 com as seguintes características: dimensão da coluna: 250 x 4,6 mm; tamanho do poro: 100 Å; limite de exclusão para proteínas: 3.000-300.000 kDa. A fase móvel usada foi PBS pH 7, filtrado através de membrana de nitrocelulose Millipore (Billerica, MA) (0,45 μ m), mantido em gelo durante toda a análise. As análises foram realizadas através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - *high performance liquid chromatography*), com detecção simultânea de absorção a 280 nm e fluorescência com excitação a 275 nm e emissão a 305 nm. Antes da injeção da amostra de A β Os, a coluna foi lavada durante 1 h com água Milli-Q e equilibrada por 1 hora com a fase móvel, ambas com fluxo de 0,5 mL/min. Inicialmente, 50 μ L de veículo (DMSO 2% em PBS) foram injetados, com fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 15

minutos. Em seguida, a coluna foi re-equilibrada com a fase móvel durante 15 minutos e 50 µL de AβOs foram injetados, e a análise feita com os mesmos parâmetros usados para o veículo. A síntese e as análises foram realizadas no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas da UFRJ.

3.2. Experimentação animal

Todos os protocolos envolvendo o uso de animais de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) (licença L008/2018) e todas as abordagens experimentais seguiram padrões éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) visando reduzir o número e minimizar o sofrimento dos animais (164).

3.3. Cultura organotípica de hipocampo

As culturas organotípicas de hipocampo foram preparadas como descrito anteriormente (158). Brevemente, três ratos *Wistar* de 6 a 8 dias de idade foram decapitados com tesouras afiadas, então o cérebro foi extraído e os hipocampos foram gentilmente dissecados com pincéis em capela de fluxo laminar estéril, mantendo o tecido hidratado com meio de dissecação (solução salina balanceada de Hank - HBSS - **Tabela 1**). Os hipocampos foram fatiados em um fatiador de tecido (*Tissue Chopper*) em seções de 400 µm e transferidos, com auxílio de uma pipeta de ponta cortada, para uma placa de petri contendo meio de dissecação. Fatias foram separadas e gentilmente transferidas com auxílio de pincéis finos para uma placa de cultura de seis poços contendo membranas semiporosas (Millicel[®]) sobre 1 mL de meio de cultivo (50% MEM, 25% HBSS, 25% soro de cavalo inativado - **Tabela 1**). Um par de fatias de hipocampo de cada animal foi depositada em cada membrana dos poços da placa de cultivo, totalizando doze fatias de hipocampo por animal, até o total de seis fatias de hipocampo por membrana, como esquematizado na **Figura 7**. Após o fim do preparo da cultura organotípica, a capela de fluxo laminar foi esterilizada novamente e as culturas receberam meio de cultivo estéril fresco. As culturas foram mantidas por 14 dias a 37°C e 5% CO₂ com trocas de meio duas vezes por semana.

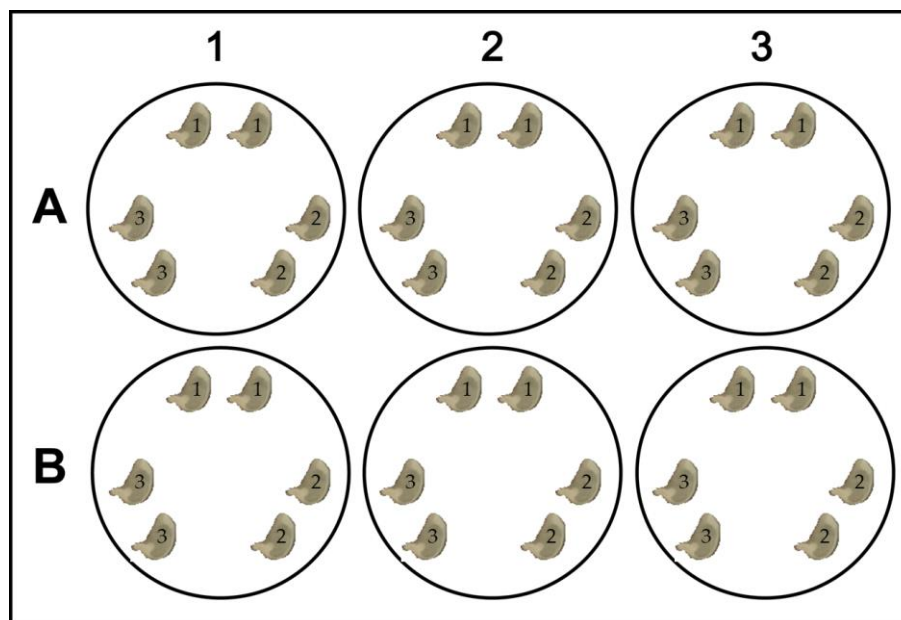


Figura 7: Esquema da placa de cultura organotípica de hipocampo: Cada placa de cultura de seis poços recebe em cada poço 6 fatias de hipocampo de ratos *Wistar* neonatos, das quais cada par é proveniente de um animal (n=3 animais por placa). No total, são obtidas 36 fatias de hipocampo, 12 de cada animal.

Tabela 1: Composição dos meios utilizados na cultura organotípica

Reagente	Meio de dissecação	Meio de cultivo
NaCl	136,89 mM	138 mM
Glicose	36,08 mM	36 mM
HEPES (238,3 g/mol)	25 mM	25 mM
KCl	5,36 mM	-
CaCl ₂	1,26 mM	2,5 mM
MgCl ₂	0,05 mM	0,5 mM
MgSO ₄	0,05 mM	0,41 mM
KH ₂ PO ₄	0,03 mM	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄	0,024 mM	-
Fungizona + Garamicina	1%	1%
Solvente		
Água Milli-Q	100%	-
MEM	-	50%
HBSS	-	25%
Soro de cavalo inativado	-	25%
pH	7,3	7,3

No 14º dia de cultivo, as culturas foram tratadas (concentração final) com 12 mM de acetato de sódio (NaAc) (Sigma-Aldrich), ou 3 mM de propionato de sódio (NaProp) (Sigma-Aldrich), ou 10 mM butirato de sódio (NaBut) (Sigma-Aldrich), ou os três metabólitos juntos (SCFAs). Em seguida foram adicionados ao meio de cultivo 500 nM de A β O ou o mesmo volume de PBS contendo 2% de DMSO (veículo) (concentração final: 0,02% DMSO). Vinte e quatro horas após os respectivos tratamentos o meio de cultivo foi coletado para dosagem de citocinas por ELISA e as fatias foram utilizadas para análises morfológicas por imunofluorescência.

3.4. ELISA

Os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no meio de cultivo foram determinados por meio de kits comerciais (R&D System). Ao final do período de tratamento das culturas os meios foram coletados e imediatamente conservados a -80°C até serem analisados.

Para realização do ensaio foram empregadas placas de 96 poços, nas quais foi adicionado 50 μ L/poço de anticorpos de captura diluídos em uma solução tampão (NaCl 1.5M, H₃BO₄ 0,5M e NaOH 1N, pH = 7.4) e incubadas por 12 horas à 4°C. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com 200 μ L/poço de solução tampão 1 (timerosal, KPO₄ 1M e Tween 20 0,005%) e posterior adição de 200 μ L/poço de solução contendo PBS e albumina bovina (BSA, 1%) por 1 hora a fim de realizar o bloqueio de sítios inespecíficos. Posteriormente as placas foram novamente lavadas 3 vezes (200 μ L/poço) com a solução tampão 1. Foi realizado um período de incubação de 2 horas à 37°C e, então, os poços foram lavados 3 vezes com a solução tampão 1. Na sequência foi adicionado 50 μ L/poço do anticorpo de detecção biotilado (50 μ g/mL) por um período de incubação de hora a temperatura ambiente, seguido de nova lavagem (200 μ L/ poço) com solução tampão 1e um período de incubação de 1 hora a temperatura ambiente com 50 μ L/ poço da mistura neutravidina horseradish peroxidase (HRP) diluído no tampão 2 (soro fetal bovino 2% em PBS). Após a última lavagem com 200 μ L/poço da solução tampão 1, foi adicionado 50 μ L/poço do substrato (K-Blue®) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (entre 5 a 30 minutos), a qual foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ (0,19 M). A leitura das placas foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos como pg/ml.

3.5. Imunofluorescência

As fatias de cultura organotípica foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,5% em PBS e bloqueadas com BSA 20% em PBS, como descrito previamente (159). Em seguida, foram cuidadosamente retiradas da membrana de cultura e incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo anti-IBA-1 de coelho diluído a 1:400 em BSA 5% em PBS para avaliar a ativação microglial. O anticorpo primário foi completamente lavado e foi adicionado o anticorpo secundário fluorescente anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 568 diluído a 1:500 em BSA 5% em PBS por 4 horas a temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi lavado e foi feita a marcação dos núcleos com corante Hoechst fluorescente azul por 30 minutos. Foi feita uma lavagem com PBS e, então, a montagem das lâminas para análise em microscópio confocal Leica TCS SP8. Foram obtidas imagens em aumento de 40x de toda a espessura do tecido (z-stack de ponta a ponta) de pelo menos dois campos de 775 μm^2 por fatia de hipocampo. As imagens foram exportadas no modo de projeção máxima e analisadas utilizando o programa *Image J*. Brevemente, as imagens foram transformadas para cores binárias, processadas para redução de ruído, então foi feita análise de partículas e foi obtida a contagem de células microgliais.

3.6. Suplementação com SCFAs e injeção intracerebroventricular de oligômeros de A β

O desenho experimental está ilustrado na **Figura 8**. Quarenta camundongos *Swiss* machos de 8 semanas de idade foram mantidos em microisoladores no biotério do Pavilhão Leônidas Deane em grupos de quatro animais por caixa com livre acesso a comida e a água, num ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, com a temperatura e humidade controladas. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo tratado com uma mistura dos SCFAs composta de 67,5 mM de NaAc, 25 mM de NaProp e 40 mM de NaBut adicionada à água dos bebedouros e o outro grupo tratado com uma quantidade equivalente de sódio (132,5 mM NaCl) na água de beber por duas semanas (64). No 14º dia, metade dos camundongos de cada grupo, ou seja, 10 animais por grupo, recebeu 10 pmol de A β O e a outra metade recebeu PBS em volume de 3 μL através de uma injeção intracerebroventricular (ICV) unilateral com uma agulha de 2,5 mm inserida a 1 mm a direita a partir do ponto da linha média equidistante de cada olho e 1mm posterior a linha desenhada pela base anterior dos olhos. Para

isto, os animais foram anestesiados usando 2.5% de isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil) num sistema de anestesia inalatória (sistema a vapor) e cuidadosamente manipulados somente durante o processo de injeção (160,161). Os camundongos que mostraram sinais de erros de injeção ou algum sinal de hemorragia foram excluídos do experimento. Vinte e quatro horas após a injeção dos A β O os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliar alterações de memória e humor relacionados à DA na ordem do menos estressante ao mais estressante, como descrito a seguir. A água dos camundongos foi trocada duas vezes por semana e o tratamento com SCFAs ou NaCl foi mantido até o fim do experimento. O peso dos animais e volume de água ingerida foram monitorados ao longo de todo o experimento.

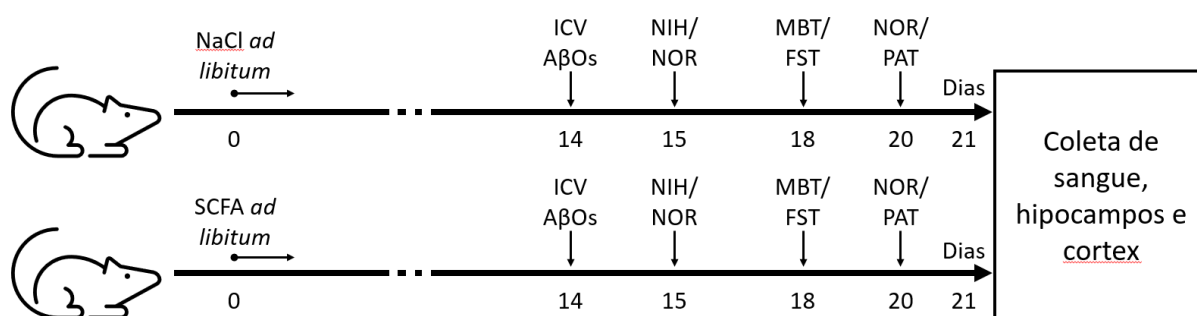


Figura 8: Desenho experimental da suplementação com SCFAs. Detalhes do experimento estão descritos na seção 3.6. O peso e consumo de água dos animais foi monitorado a cada 7 dias. NIH: supressão alimentar induzida pela novidade (*novelty induced hypophagia*). NOR: reconhecimento de objeto novo (*novel object recognition*). MBT: teste de esconder esferas (*marble burying test*). FST: teste de nado forçado (*forced swim test*). PAT: teste de esquiva passiva (*passive avoidance test*).

3.7. Depleção da microbiota bacteriana intestinal

O desenho experimental está ilustrado na **Figura 9**. Quarenta camundongos *Swiss* machos de 8 semanas de idade foram mantidos como descrito acima e divididos aleatoriamente em dois grupos, dos quais um desses foi tratado por duas semanas com uma solução de antibióticos de amplo espectro (ABX) contendo 0,5 mg/mL de ampicilina, 0,5 mg/mL de neomicina, 0,5 mg/mL de metronidazol e 0,25 mg/mL de vancomicina adicionados à água do bebedouro como descrito anteriormente (162). Em seguida, os grupos foram divididos em dois e foi iniciado o protocolo de tratamento com os SCFAs por duas semanas, como descrito acima, mantendo o tratamento com antibióticos do grupo depletado. No 28º dia metade dos animais

receberam os A β O e metade recebeu PBS por via ICV, totalizando 5 animais por grupo, e no 29º dia iniciaram-se os experimentos de comportamento. O peso dos animais e volume de água ingerida foram monitorados ao longo de todo o experimento. Os tratamentos pela água continuaram até o fim do experimento.

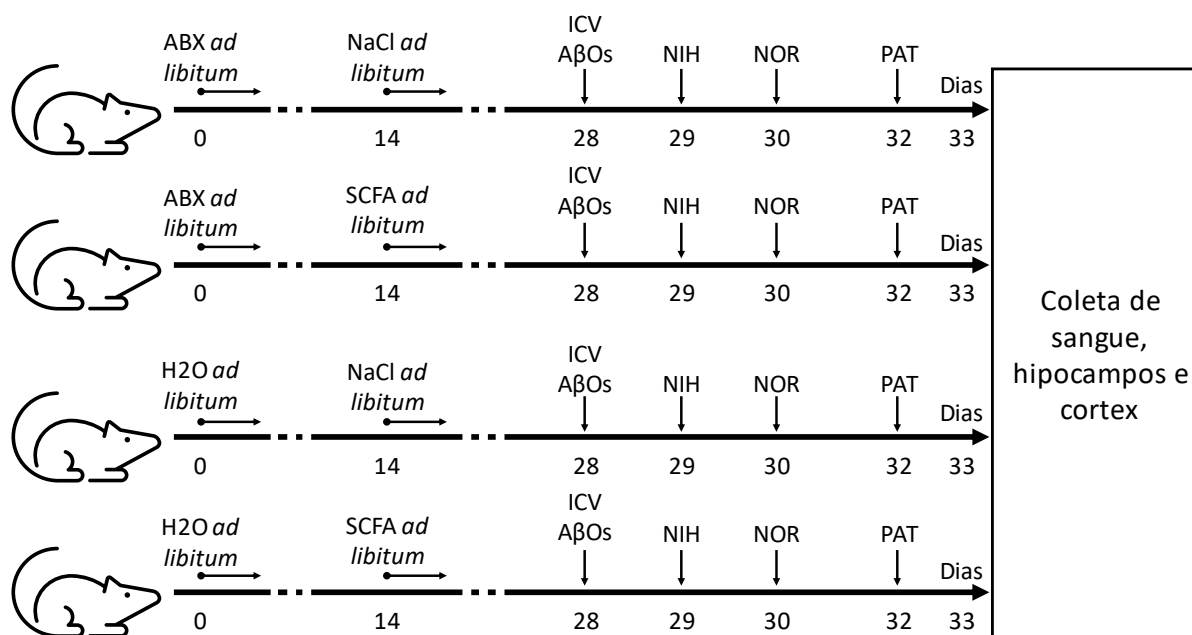


Figura 9: Desenho experimental da depleção da microbiota intestinal por antibióticos de amplo espectro e suplementação com SCFAs. Detalhes do experimento estão descritos na seção 3.7. O peso e consumo de água dos animais foi monitorado a cada 7 dias. ABX: solução de antibióticos de amplo espectro. NIH: supressão alimentar induzida pela novidade (*novelty induced hypophagia*). NOR: reconhecimento de objeto novo (*novel object recognition*). PAT: teste de esquiva passiva (*passive avoidance test*).

3.8. Teste de supressão alimentar pela novidade

Os camundongos foram submetidos a jejum alimentar, mas não hídrico, por 24 horas, após o qual foram colocados em caixas de acrílico pretas nas dimensões 50x50x39 cm contendo um *pellet* de ração no centro. Foi registrado o tempo até o primeiro episódio de alimentação (latência), com limite máximo de 5 minutos. Imediatamente após, os animais foram transferidos para micro-isoladores limpos contendo *pellets* de comida pesados previamente e mantidos por 5 minutos. Por fim, foi registrado a quantidade (mg) de *pellets* consumidos pelo animal. Antes

do início de todos os testes comportamentais, os animais foram habituados por 30 minutos à sala de experimentação com luz, ruído e temperatura controlados. As caixas de teste e micro-isoladores foram limpos com álcool 70% entre um animal e outro.

3.9. Teste de reconhecimento de objeto novo (NOR)

O teste foi realizado em caixas de acrílico pretas nas dimensões 50x50x39 cm e foi dividido em três fases: (1) campo aberto, em que os camundongos exploram livremente a caixa vazia por 5 minutos; (2) treinamento, em que os animais exploram dois objetos idênticos dentro da caixa por 5 minutos; (3) teste, em que um dos objetos da fase anterior é substituído por um objeto novo e os animais exploram os dois por 5 minutos. A fase de teste foi realizada duas horas após a fase de treino. As sessões foram filmadas com auxílio do programa ANY-Maze e foi registrado o tempo de exploração de cada objeto pelo camundongo, considerando que o animal explorou o objeto quando este foi tocado pelas patas ou pelo focinho. O tempo de exploração de cada objeto foi convertido em percentual e expresso como porcentagem de reconhecimento do objeto, a qual foi obtida através da multiplicação do tempo de exploração de cada objeto por 100 e o valor resultante dividido pelo tempo total de exploração. Os resultados foram analisados comparando a média do tempo de exploração em cada objeto com o valor fixo de 50% (* \neq 50%). Por definição, os animais que reconhecem o objeto familiar e aprendem a tarefa deveriam explorar mais 50% do tempo o objeto novo. As caixas e seus elementos foram limpos com álcool 70% a cada sessão (163). Os objetos utilizados para exploração foram artefatos de plástico, com diferentes tamanhos, cores, texturas e formatos. Eles foram fixados com fita adesiva no chão da caixa e os animais não conseguiam movê-los.

3.10. Teste de esconder esferas

Foram utilizados micro-isoladores limpos preenchidos com maravalha até 5 cm de altura distribuída uniformemente. 20 esferas de vidro foram distribuídas uniformemente sobre a maravalha no formato de 4x5. Cada camundongo foi colocado individualmente na caixa por um período de 30 minutos. Ao final do teste, o animal foi cuidadosamente retirado e foram contadas as esferas escondidas (mais de 2/3 da superfície da esfera escondida) (164).

3.11. Teste de nado forçado (FST)

Os camundongos foram submetidos a natação forçada por 6 minutos em um contêiner cilíndrico contendo água a temperatura de 24°C em quantidade suficiente para impedir o apoio das patas no fundo do cilindro, mas evitando a fuga pela borda superior. A água foi trocada entre cada animal. O tempo de natação foi dividido em 2 primeiros minutos, em que a maioria dos animais apresenta comportamento de tentativa de fuga, e 4 últimos minutos, em que surge o comportamento de imobilidade. O tempo de imobilidade foi cronometrado e usado como parâmetro para comportamento do tipo-depressivo (165), onde um aumento no tempo de imobilidade durante esse teste representa uma redução no comportamento de desespero de tentar sair da situação.

3.12. Teste de esquiva passiva

O teste de esquiva passiva foi realizado utilizando uma caixa de metal fosca (Insight) com uma das paredes em acrílico, uma pequena área do assoalho plana (plataforma de escape) e uma área maior de barras condutoras de eletricidade, a qual é ligada a um aparelho que permite regular e disparar um choque elétrico nas barras. O teste é composto por uma sessão de treino e uma sessão de teste, que são realizadas em dias consecutivos. Na sessão de treino, os camundongos foram colocados na área plana da caixa e foi registrado o tempo de latência para descer com as quatro patas na área das barras. Nesse momento, os animais receberam um choque de 0,4 miliamperes durante 3 segundos, após o qual foram devolvidos às caixas de residência. Na sessão de teste, 24h após o treino, os animais foram colocados novamente na área plana da caixa e foi cronometrado o tempo de latência para a descida do animal com as quatro patas na área de barras até um limite máximo de 5 minutos. O tempo de latência na sessão de teste foi usado como parâmetro para a memória aversiva.

3.13. Avaliação de acetilação de histonas por *Western Blotting*

Camundongos *Swiss* foram injetados intraperitonealmente com 750 mg/kg de butirato de sódio e submetidos à eutanásia 30 e 60 minutos após a injeção (173–175). O hipocampo foi coletado e homogeneizado em tampão de extração de proteínas (RIPA) contendo inibidor de protease e inibidor de fosfatase. A quantidade total de proteínas foi determinada pelo método de ácido bicinonínico (BCA, Thermo Fisher Scientific). Os homogenatos então foram diluídos em tampão de amostra contendo 125 mM Tris-Cl, 10 % de SDS, 0,05 % de Azul de Bromofenol, 5% de β -mercaptoetanol e 50% de glicerol ou tampão de amostra contendo 125 mM Tris-Cl, 10 % de SDS, 0,05 % de Azul de Bromofenol e 50% de glicerol. Para eletroforese, 40 μ g de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 14%) com tampão de corrida desnaturante Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS - pH 8,3) em voltagem constante (150 V) por aproximadamente 1:30h. As proteínas foram então eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL) em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 10 % metanol - pH 8,3) por 1:30h em voltagem constante (100V) a 4°C.

A transferência foi verificada pelas bandas do padrão de peso molecular na membrana, e pela coloração desta com vermelho de Ponceau (0,1% Ponceau-S em 5% ácido acético) por 3 minutos posteriormente lavadas com tampão salino de Tris-Tween (TBS-T - *Tris-buffered saline-Tween*).

Foram analisadas as expressões de histonas 3 e 4 acetiladas e totais por meio de *Western blot* com anticorpos específicos para cada proteína. Para tal, as membranas foram bloqueadas com BSA 5% por 1h em temperatura ambiente seguido pela incubação overnight com um anticorpo por vez: anti- histona H3 (1:1000), lys-9-acetil-histona-3 (H3K9Ac) (1:1000), histona H4 (1:1000), lys-16-acetil-histona-4 (H4K16Ac) (1:1000) e β -actina (1:5000) diluídos em solução de bloqueio. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase anti-IgG de coelho (1:1000) ou de camundongo (1:1000), por 1h. Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 1 vez com tampão salino de Tris (TBS - *Tris-Buffered Saline*), e as bandas reveladas por quimioluminescência com o substrato Pierce™ ECL SuperSignal West Femto Maximum Sensivity (ThermoFisher) e visualizadas com o sistema de imagem *C-Digit* (Uniscience). As imagens digitalizadas foram salvas em alta resolução (300 dpi) e as bandas foram quantificadas por densitometria das imagens no software ImageJ V.1.48. Os resultados foram representados como a média \pm erro padrão dos valores de densitometria normalizados pela média do veículo.

3.14. Análise estatística

Os dados obtidos das quantificações foram dispostos em planilhas do software *GraphPad Prism* 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA) e testados quanto à normalidade. Os dados são expressos como média e desvio padrão da média dos valores obtidos em experimentos independentes. O teste estatístico aplicado, indicado em cada resultado, foi escolhido em função análise de distribuição dos resultados e das condições experimentais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas sempre que o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito dos SCFAs sobre a neuroinflamação induzida pelos A β Os na cultura organotípica

Inicialmente, avaliamos o efeito do butirato (NaB) e do propionato (NaP), os dois SCFAs com efeito biológico mais pronunciado (166–168), sobre a neuroinflamação induzida pelos A β Os. Nossos resultados mostram que o tratamento de culturas organotípicas de hipocampo com ambos os SCFAs levou a uma redução significativa nos níveis das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 no meio de cultivo induzidos pelos A β Os (**Figura 10**).

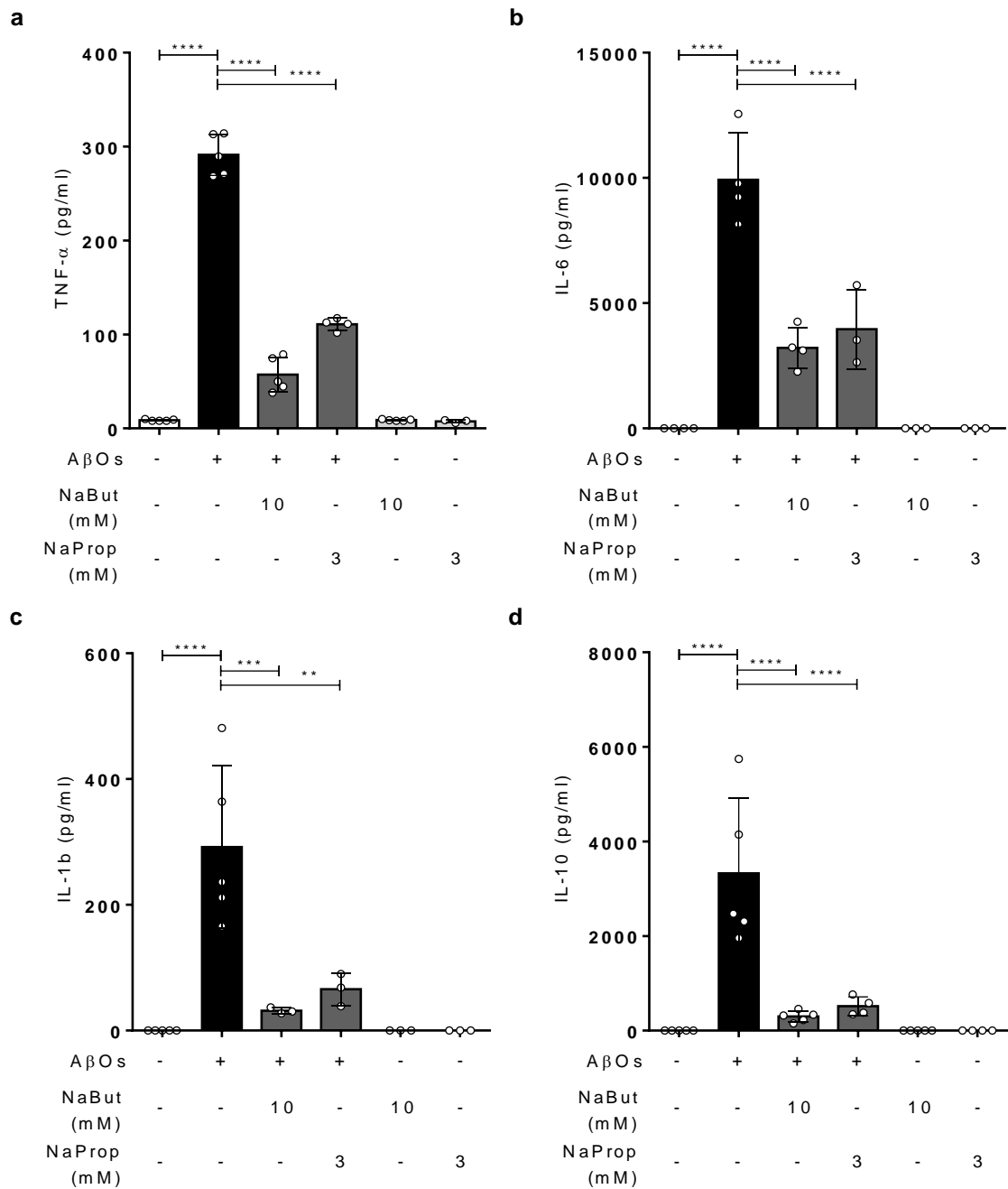


Figura 10: Butirato de sódio e propionato de sódio reduzem a secreção de citocinas induzida por AβOs *in vitro*. Culturas organotípicas de hipocampo foram expostas ao veículo ou a 500 nM de AβOs e tratadas com 10 mM de butirato de sódio (NaBut) ou 3 mM de propionato de sódio (NaProp). Os níveis das citocinas TNF-α (a), IL-6 (b), IL-1β (c) e IL-10 (d) foram determinados por ELISA no meio de cultivo 24 horas após tratamento com os SCFAs e a exposição aos AβOs (n= 3-5 culturas independentes, pool de 3 animais por cultura. ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Šidák, **p< 0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

Uma vez que o tratamento das culturas com butirato ou propionato levou a uma significativa redução dos níveis das citocinas inflamatórias, nós avaliamos a ativação da microglia. A imunomarcação para IBA-1 (indicador de ativação microglial) nas fatias da cultura organotípica de hipocampo mostrou claramente a capacidade do butirato de sódio isoladamente ou em conjunto com propionato e butirato (SCFA) em reduzir a quantidade de células da microglia positivas para IBA-1. O mesmo efeito não foi observado no tratamento com acetato de sódio ou propionato de sódio. Não foi possível observar a diferença no número de células positivas para IBA-1 entre culturas expostas aos A β O s e culturas expostas ao veículo (**Figura 11**).

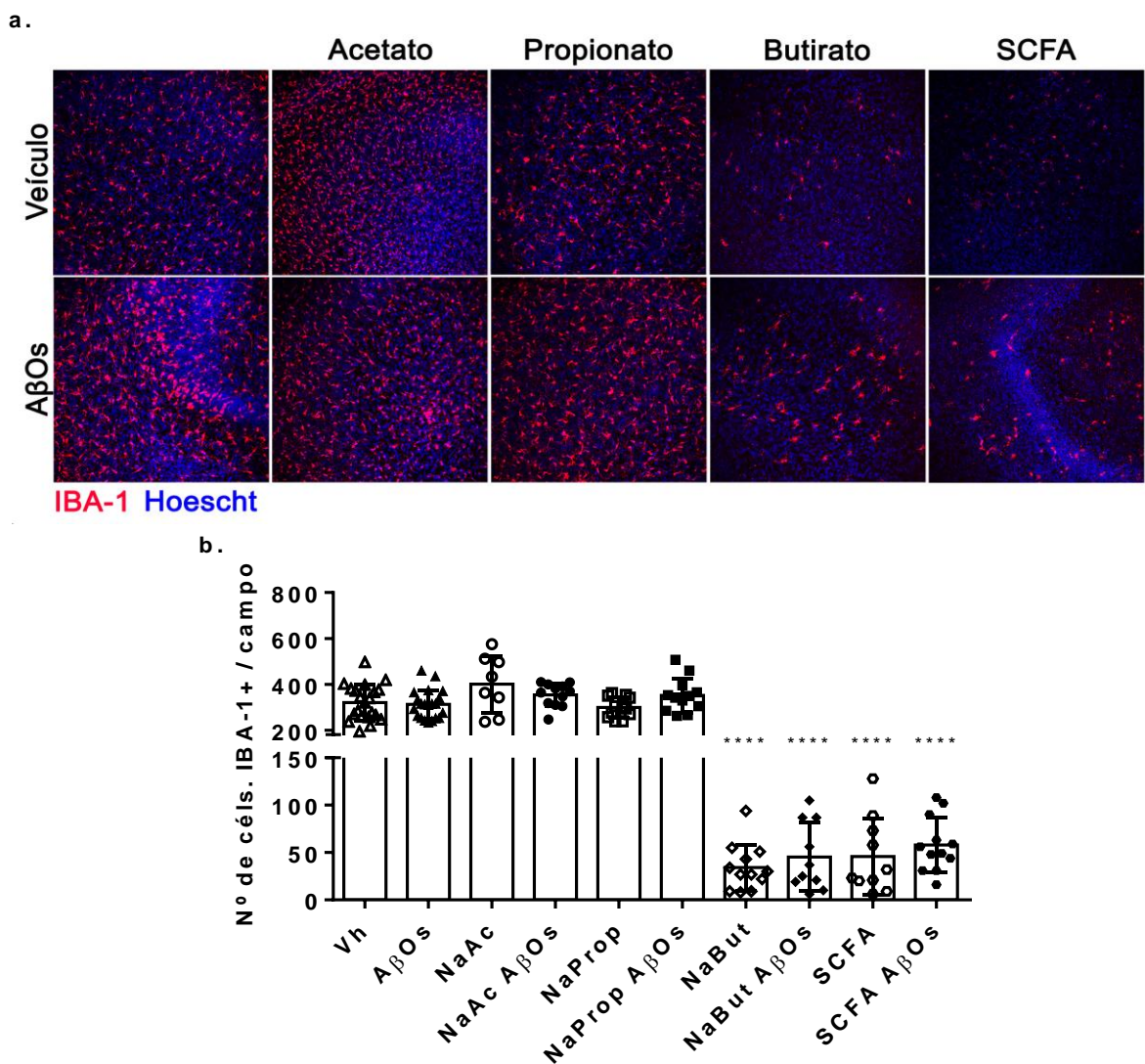


Figura 11: Butirato de sódio reduz o número de células da microglia positivas para IBA-1 em fatias de cultura organotípica de hipocampo. As culturas foram tratadas com 12 mM de acetato de sódio (NaAc), 3 mM de propionato de sódio (NaProp), 10 mM butirato de sódio (NaBut) ou a combinação dos três ácidos graxos (SCFA) e expostas a 500 nM de A β O ou veículo sem peptídeo (Vh) como descrito nos métodos. Vinte e quatro horas após as fatias foram fixadas e marcadas para IBA-1. (a) Em vermelho células imunomarcadas por IBA-1, em azul núcleos de células marcadas por Hoescht. Cada painel mede 775 μ m x 775 μ m (b) Contagem de células marcadas por IBA-1. (n= 2 culturas independentes. ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm–Šidák, ****p<0,0001).

4.2. Efeito da suplementação com SCFAs sobre a alterações comportamentais induzidas pelos A β Os

Dado os resultados indicando que os SCFAs reduzem os níveis das citocinas inflamatórias no modelo *in vitro* e considerando as crescentes evidências mostrando que a modulação da microbiota intestinal com aumento na produção destes ácidos graxos modula a homeostasia cerebral, buscamos investigar o efeito da suplementação com os SCFAs sobre alterações comportamentais em um modelo *in vivo* da DA. A adição dos SCFAs na água de beber dos animais não alterou o consumo de água nem o peso dos animais (**Figura 12**).

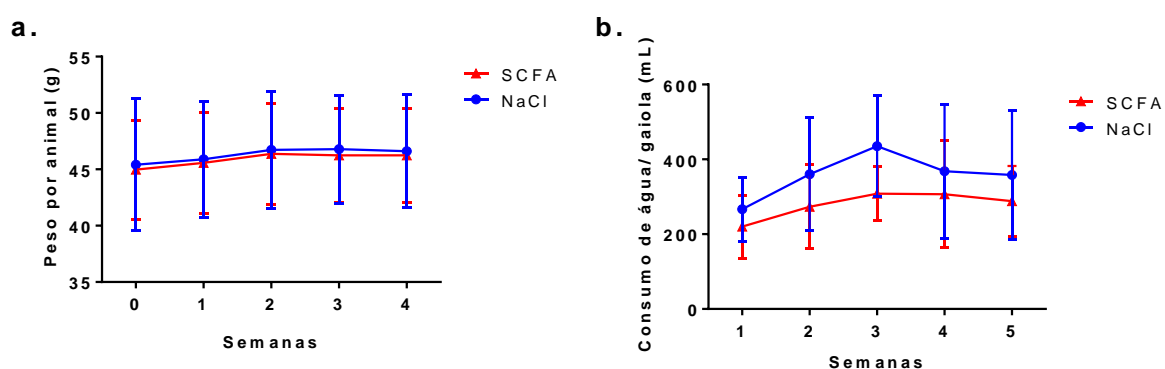


Figura 12: Acompanhamento do peso corporal e consumo de água de camundongos sob suplementação com SCFAs. Os animais foram suplementados com os SCFAs ou quantidade equivalente de cloreto de sódio durante 14 dias e foram pesados semanalmente em balança analítica. A partir da primeira semana, foi medida a quantidade de água ingerida em cada gaiola por semana. Não foi detectada nenhuma variação significativa de peso (a) ou consumo de água

(b) nos animais em experimentação em qualquer condição de tratamento (n=19 animais por grupo). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e pós-teste de Holm–Šidák).

Para avaliar o efeito dos SCFAs sobre alterações cognitivas e comportamentais induzidas pelos A β Os, um grupo de animais recebeu uma injeção intracerebroventricular de A β Os e todos os animais foram submetidos aos testes de reconhecimento de objetos (NOR), esQUIVA inibitória, nado forçado (FST), esconder esferas, e supressão alimentar pela novidade. Resultados representativos dos testes comportamentais estão sumarizados na **Figura 13**. Ainda que nenhuma alteração na memória de reconhecimento tenha sido observada 24 horas após a injeção dos A β Os (**Figura 13a**), seis dias após a injeção dos A β Os os animais apresentaram comprometimento cognitivo o qual foi parcialmente prevenido pelos SCFAs (**Figura 13b**). Todos os animais apresentaram atividade locomotora comparável no campo aberto e não houve preferência por nenhum objeto durante a fase de treino.

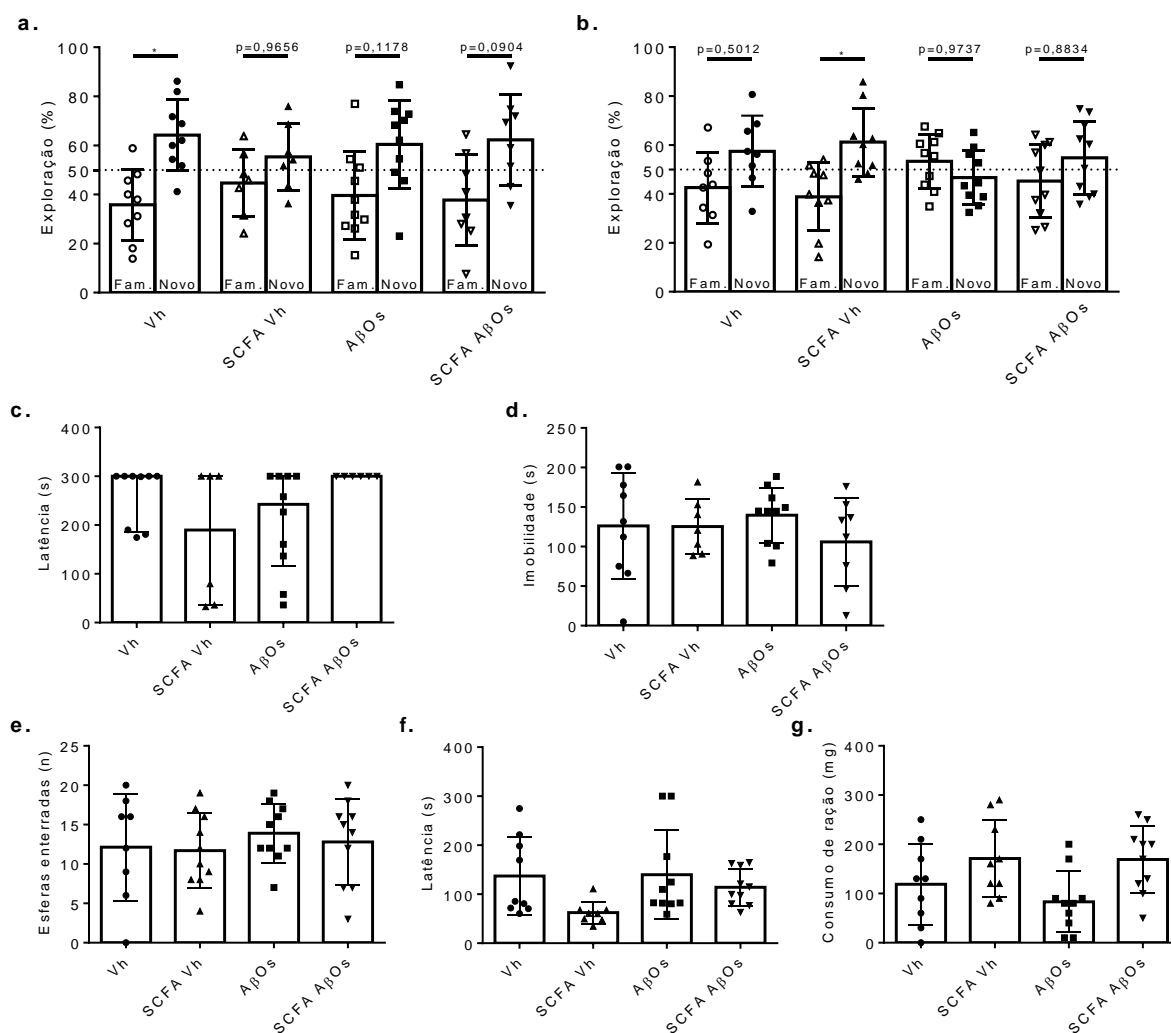


Figura 13: Alterações cognitivas e comportamentais em camundongos tratados com SCFAs. Os animais foram suplementados com SCFAs ou quantidade equivalente de cloreto de sódio durante 14 dias e receberam 10 pmoles de A β Os ICV. (a) percentual de exploração de um objeto familiar (Fam.) ou novo no teste NOR 24 horas após a injeção ICV de 10 pmol de A β Os. Os resultados são expressos como a porcentagem do tempo de exploração em cada objeto em relação ao tempo total de exploração durante a sessão de teste, e analisados estatisticamente usando o teste t de uma amostra, que compara a média do tempo de exploração em cada objeto com o valor fixo de 50%. Por definição, os animais que reconhecem o objeto familiar e aprendem a tarefa deveriam explorar mais 50% do tempo o objeto novo. (b) percentual de exploração de um objeto familiar (Fam.) ou novo (New) no teste NOR 6 dias após a injeção ICV de A β Os. (c) Tempo de latência para a descida da plataforma no teste de esquiua passiva. Resultado expresso como mediana e intervalo interquartis. (d) Tempo de imobilidade no FST. (e) Número de esferas escondidas por animal no teste de esconder esferas. (f) Tempo de latência no teste de supressão alimentar pela novidade até o primeiro evento de alimentação no campo aberto. (g) Quantidade de ração ingerida no micro-isolador após o teste de supressão alimentar pela novidade. n=8-10 animais por grupo. Resultados são expressos como média e desvio-padrão e foram analisados por ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Šidák. *p<0,05. Onde não constar, p>0,05.

Para avaliar a memória aversiva, os animais foram submetidos ao teste de esquiua passiva 7 dias após a injeção dos A β Os (**Figura 13c**). Ainda que preliminar, nossos resultados mostram que o grupo injetado com A β Os apresenta uma tendência de dano cognitivo, o que é prevenido pelo tratamento com metabólitos (**Figura 13c**). No FST os animais do grupo injetado com A β Os tenderam a ficar mais tempo imóveis do que o grupo controle, o que poderia estar relacionado a um comportamento tipo-depressivo (**Figura 13d**). O tratamento com metabólitos não pareceu influenciar o tempo de nado quando isolado, mas mostrou forte tendência a melhorar o comportamento tipo-depressivo dos animais injetados com A β Os (**Figura 13d**).

No teste de esconder esferas não foi possível observar diferenças no comportamento ansioso/repetitivo dos camundongos (**Figura 13e**). No teste de supressão alimentar pela novidade, os animais dos grupos tratados com SCFAs, tanto injetados com veículo como com os A β Os, apresentaram a forte tendência de um menor tempo de latência até o primeiro evento de consumir a ração e de consumirem mais ração quando retornados ao micro-isolador (**Figura 13f e 13g**). No entanto, a exposição aos A β Os não pareceu influenciar no comportamento dos animais.

4.3. Efeito da suplementação com SCFAs sobre alterações comportamentais induzidas pelos AβOs em animais que foram submetidos a depleção da microbiota intestinal

Para avaliar o efeito dos SCFAs em condições em que a microbiota bacteriana intestinal encontra-se alterada, um grupo de animais foi tratado por 2 semanas com solução de antibióticos contendo 0,5 mg/mL de ampicilina, 0,5 mg/mL de neomicina, 0,5 mg/mL de metronidazol e 0,25 mg/mL de vancomicina para a depleção da microbiota bacteriana e em seguida suplementados com os SCFAs por 2 semanas. O tratamento com antibióticos levou a uma perda de peso na primeira semana quando comparados aos animais não tratados, porém essa diferença desapareceu a partir da segunda semana de tratamento (**Figura 14a**). Da mesma forma, o consumo de água foi mais baixo no grupo tratado com antibióticos quando comparado ao grupo não depletado, porém logo se normalizou (**Figura 14b**).

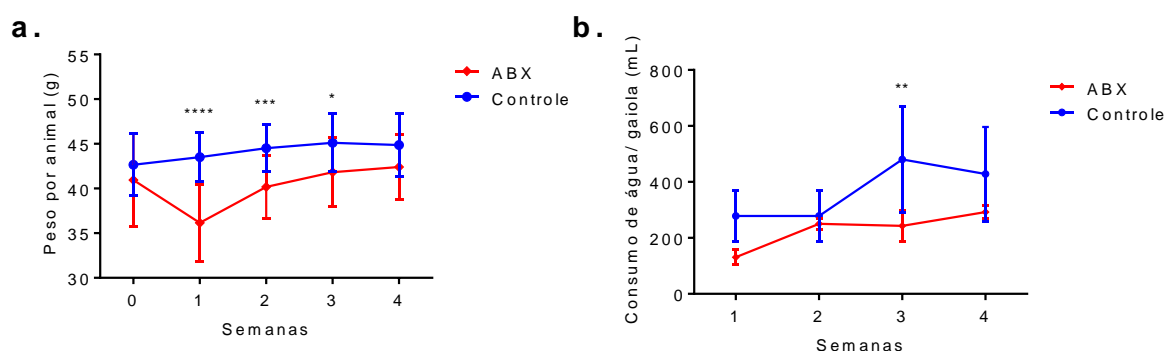


Figura 14: Acompanhamento do peso corporal e consumo de água de camundongos tratados com antibióticos e suplementados com SCFAs. Metade dos animais foi tratada com uma solução de antibióticos (ABX - 0,5 mg/mL de ampicilina, 0,5 mg/mL de neomicina, 0,5 mg/mL de metronidazol e 0,25 mg/mL de vancomicina) durante um total de 28 dias e todos foram pesados semanalmente em balança analítica. A partir da primeira semana, foi medida a quantidade de água ingerida em cada gaiola por semana. (a) Animais tratados com antibióticos apresentaram perda de peso na primeira semana, porém normalização a partir da segunda. (b) Não foi detectada nenhuma alteração no consumo de água (n=20 animais por grupo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e pós-teste de Holm–Šidák, *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001).

Para avaliar o efeito dos SCFAs nos animais que sofreram depleção da microbiota bacteriana intestinal, os animais foram submetidos aos testes de NOR, esquiva passiva e supressão alimentar pela novidade após a injeção de A β Os. Resultados preliminares demonstram que apenas os animais injetados com os A β Os e os animais que tiveram a microbiota bacteriana depletada apresentaram claro déficit de aprendizado (**Figura 15a**). Interessantemente, o tratamento com metabólitos foi capaz de prevenir parcialmente o dano cognitivo induzido pelos A β Os. Surpreendentemente, os animais com a microbiota bacteriana depletada, mas injetados com A β Os tiveram uma melhora no aprendizado. Todos os animais apresentaram atividade locomotora comparável no campo aberto e não houve preferência por nenhum objeto durante a fase de treino.

Já no teste de esquiva passiva, o pequeno número de animais em cada grupo e a grande variação observada dificulta a interpretação dos resultados (**Figura 15b**). No teste de supressão alimentar pela novidade, apesar dos animais injetados com A β Os apresentarem latência para se alimentarem maior do que animais controle, a depleção da microbiota bacteriana parece reduzir o comportamento ansioso dos animais, mesmo quando injetados com os A β Os (**Figura 15c**). Nenhum grupo apresentou alteração significativa na quantidade de ração consumida no pós-teste (**Figura 15d**)

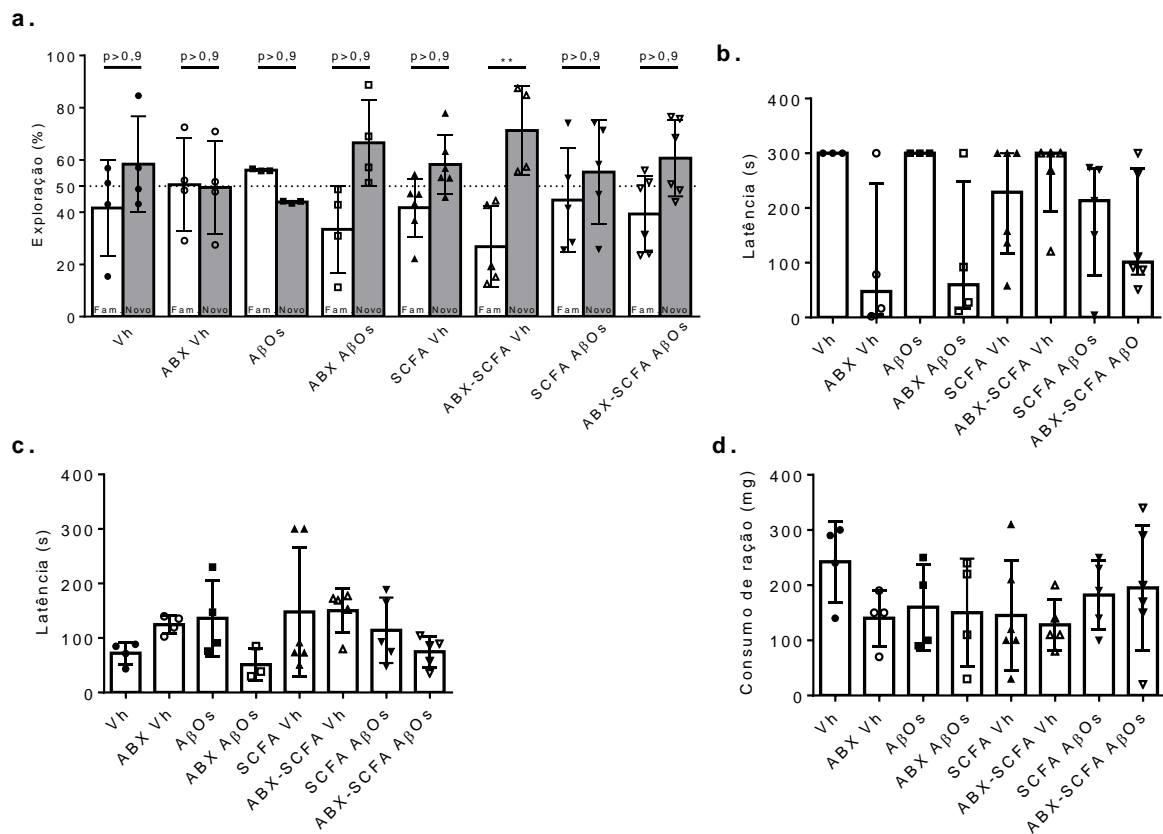


Figura 15: Alterações cognitivas e comportamentais induzidas pelos AβOs em animais submetidos a depleção da microbiota bacteriana intestinal e suplementados com SCFAs.

Os animais foram submetidos ao tratamento com antibióticos durante 14 dias como descrito na metodologia. Na sequência, receberam uma suplementação com SCFAs ou quantidade equivalente de cloreto de sódio durante 14 dias e, então, receberam 10 pmoles de AβOs ICV. (a) percentual de exploração de um objeto familiar (Fam.) ou novo (New) no teste NOR. Os resultados são expressos como a porcentagem do tempo de exploração em cada objeto em relação ao tempo total de exploração durante a sessão de teste, e analisados estatisticamente usando o teste t de uma amostra, que compara a média do tempo de exploração em cada objeto com o valor fixo de 50%. Por definição, os animais que reconhecem o objeto familiar e aprendem a tarefa deveriam explorar mais 50% do tempo o objeto novo (2 d.p.i.; n = 3~6 animais/grupo). (b) Tempo de latência no teste de esquila passiva até o animal descer da plataforma. Resultado expresso como mediana e intervalo interquartis. (c) Tempo de latência no teste de supressão alimentar pela novidade até o primeiro evento de consumo de ração no campo aberto. (d) Quantidade de ração ingerida no micro-isolador após o teste de alimentação suprimida. n=4-6 animais por grupo. Resultados são expressos como média e desvio-padrão e

foram analisados por ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Šidák. $**p < 0,01$. Onde não constar, $p > 0,05$.

4.4. Efeito do butirato sobre a acetilação de histonas

Considerando a redução das citocinas induzidas pelos A β O s mediada pelo tratamento com butirato e dado sua potente ação sobre a inibição de histonas desacetilases, camundongos *Swiss* foram injetados intraperitonealmente com butirato de sódio e submetidos à eutanásia 30 e 60 minutos após a injeção. Nossos resultados indicam que o butirato induziu um aumento na acetilação de histonas 3 (peso molecular aproximado de 17 kDa) e 4 (peso molecular aproximado de 11 kDa) em ambos os tempos, como pode ser observado pelo aumento na proporção de histonas acetiladas sobre histonas totais (**Figura 16**).

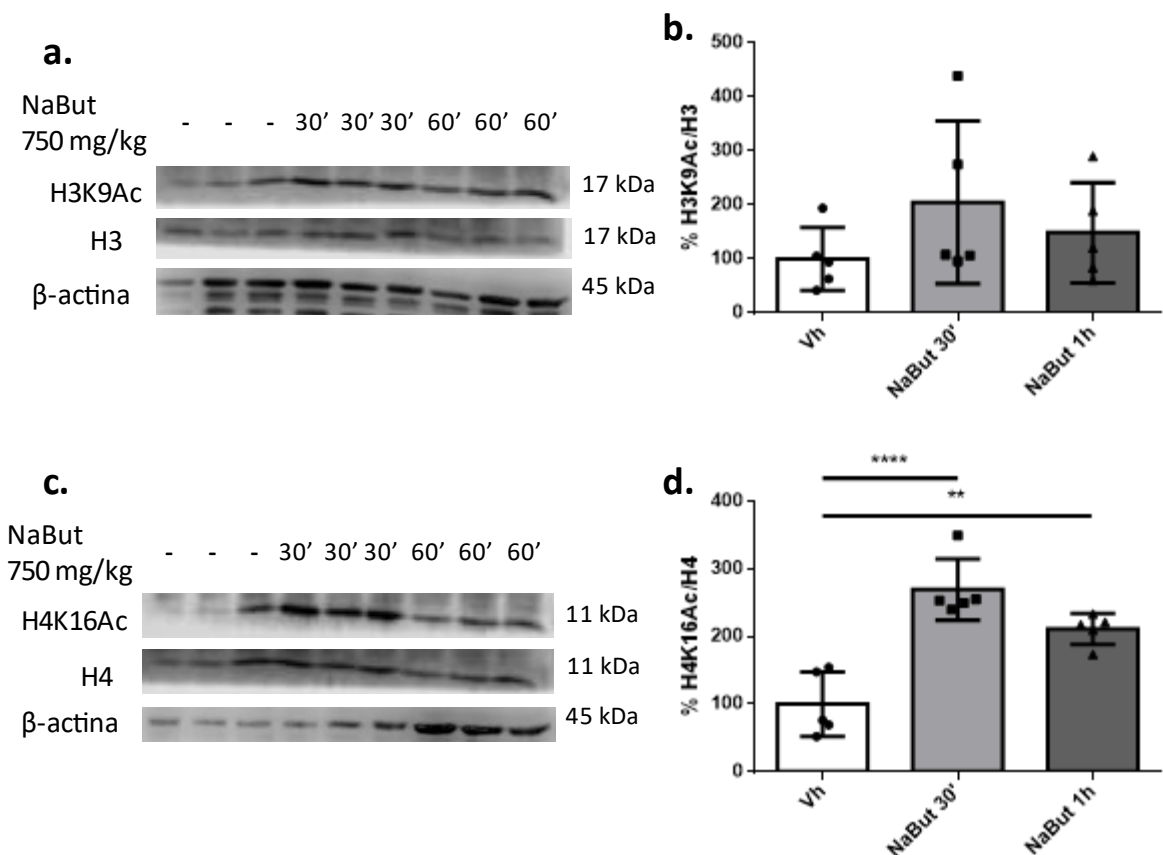


Figura 16: Butirato aumenta a acetilação de histonas no hipocampo. A acetilação das histonas 3 e 4 foram analisadas por *Western blot*. (a) Imagem representativa da imunomarcagem de histona 3 acetilada (H3K9Ac) e total (H3) e (b) quantificação das bandas. (c) Imagem

representativa da imunomarcaçãode histona 4 acetilada (H4K16Ac) e total (H4) e (d) quantificação das bandas (n=5 animais por grupo, ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Šidák, **p< 0,01, ****p<0,0001).

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm descrito que a microbiota intestinal possui um papel crucial no neurodesenvolvimento, desempenhando uma função central na maturação e na funcionalidade de células da glia (10,29,64). De fato, distúrbios da microbiota podem levar à ocorrência de uma microglia imatura e hiper-responsiva em fases posteriores da vida (64,121). Curiosamente, essas alterações ocorrem de forma similar àsquelas observadas em camundongos nocaute para os receptores de SCFAs FFAR2 e FFAR3 (169) e a suplementação com SCFAs em camundongos selvagens é capaz de reverter esse perfil da microglia, reduzindo sua hiper-responsividade (64,120,124,170). Além disso, os SCFAs também apresentam efeito modulador sobre a sinalização inflamatória por astrócitos, reduzindo a secreção de IL-1 β e aumentando a de TGF- β *in vitro*, ainda que seus efeitos na maturação e função astrocitária no contexto de doenças neurodegenerativas não seja completamente conhecido (126)

Corroborando com estes estudos, nossos resultados mostram que mediante tratamento com propionato e butirato, culturas organotípicas de hipocampo expostas aos A β Os apresentaram redução na secreção de todas as citocinas analisadas: TNF- α , IL-1 β , IL-6, pró-inflamatórias, e também IL-10, anti-inflamatória. Ainda que os mecanismos desencadeados por estes SCFAs não tenham sido avaliados, uma provável explicação poderia estar baseada na indução de um ambiente anti-inflamatório no tecido, via modulação da microglia, desencadeada pelo tratamento com propionato de sódio e o butirato de sódio. Concomitantemente, observamos um aumento nos níveis de IL-10 induzida pelos A β Os que também foram reduzidos pelos SCFAs. O aumento desta citocina poderia ser um mecanismo de proteção intrínseca do tecido face à toxicidade desencadeada pelos A β Os e que também foi modulada pelo propionato e butirato. Por outro lado, a redução na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias pode induzir por feedback positivo também na redução da secreção de IL-10, uma vez que não há o microambiente inflamatório para ser equilibrado (170).

Nesse contexto, a área de neuroimunologia tem expandido vastamente o entendimento da DA, uma vez que a microgliose e astrogliose são componentes marcantes na fisiopatologia da doença. Análises de genoma completo já mostraram que diversos fatores de risco genético estão associados a genes expressos exclusivamente na microglia no SNC, como TREM2 e CD33 (139). Além disso, análises de transcriptoma de célula única levaram à definição de um perfil microglial associado a doença (DAM - *Disease associated microglia*), que consiste no aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e redução de genes homeostáticos (171,172). No entanto, o efetivo papel da microglia na DA parece ser elusivo, pois é necessária a ativação de um perfil fagocítico por meio de receptores de membrana, como TREM2 e receptores TAM, para a limpeza de peptídeos neurotóxicos e neuritos distróficos (173,174), porém esse processo também desencadeia a secreção de citocinas pró-inflamatórias com consequente dano tecidual (142,175). Importaneamente, parte considerável do dano tecidual se dá pela comunicação microglia-astrócito levando a ativação de vias inflamatórias e perda de funções de manutenção neuronal (143,175). Essa transição da função microglial provavelmente está atrelada ao estágio de progressão da DA, de forma que o entendimento dos fatores que podem modular essas funções pode abrir horizontes para novas abordagens terapêuticas.

Outra possível explicação para o resultado sobre as citocinas obtido com NaBut e NaProp consiste na inativação direta da produção de citocinas pela microglia e pelos astrócitos induzida pelos SCFAs, seja por sinalização via receptores (169) seja por modulação epigenética via acetilação de histonas (120,124,170). Nesse contexto, a acetilação de histonas tem se mostrado muito relevante para maturação e ativação microglial. Isso foi evidenciado em animais que quando sofrem nocaute para HDAC1 e HDAC2 no período pré-natal apresentam baixo número de células devido a elevada apoptose. Porém, quando o nocaute ocorre no período adulto células microgliais não só sobrevivem como também respondem melhor contra o A β , levando a menor deposição e melhora cognitiva (176). Dessa forma, a memória imune inata da microglia, caracterizada por treinamento ou tolerância à dado estímulo, é mediada por acetilação de histonas e possivelmente outras alterações epigenéticas (177).

Nesse sentido, resultados prévios do nosso grupo já demonstraram que o tratamento de animais com butirato de sódio leva a uma redução de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e no córtex frontal de camundongos injetados com A β Os. Uma vez que o butirato é conhecido como um potente inibidor de HDAC, o que já foi associado à indução de um perfil anti-inflamatório da microglia (124,166,178), nós observamos que camundongos tratados intraperitonealmente com butirato apresentaram um aumento na acetilação das histonas 3 e 4 no hipocampo, as quais desempenham uma importante função na modulação epigenética

microglial. Este resultado corrobora com a teoria de que os SCFAs são mediadores da comunicação no eixo microbiota-intestino-cérebro (28,73,91).

Ainda relacionado ao efeito dos SCFAs sobre a função microglial, foi constatado pelas imagens de imunofluorescência que o butirato é capaz de reduzir o número de células da microglia positivas para IBA-1. A expressão de IBA-1 é restrita a populações de macrófagos e se apresenta aumentada mediante ativação microglial, estando relacionada a motilidade da membrana (179). Isso pode ser indicativo, pelo menos para o butirato, de que a maior parte da microglia se torna inativa quando exposta a este SCFA. Os outros metabólitos não apresentaram tal redução no número de células positivas para IBA-1; entretanto, ainda é necessário analisar outros aspectos dessas células, como intensidade de fluorescência e morfologia, uma vez que a morfologia microglial é um forte indicador do perfil dessa célula com relação à resposta imune (64,124). Ainda que nós não observemos diferenças no número de células positivas para IBA-1 entre o grupo controle e o exposto aos A β Os, a análise da circularidade celular e do número de processos pode revelar alterações microgliais desencadeadas pelos A β Os importantes na mediação da neuroinflamação.

Infelizmente nosso modelo *in vitro* é capaz de responder apenas sobre o papel isolado da resposta imune inata cerebral no processo neuroinflamatório da DA, no entanto crescentes evidências apontam para um papel importante da resposta imune periférica e adaptativa na modulação da doença. Pacientes acometidos pela DA apresentam disfunção da vasculatura linfática cerebral e uma marcante redução na população de linfócitos CCR7+, o que foi reproduzido em modelo murino transgênico para a doença (5xFAD) e permitiu observar que tanto camundongos com pouca cobertura linfática quanto os nocautes para CCR7 tem a progressão da doença agravada. Interessantemente, os modelos utilizados apresentaram aumento de deposição de A β , da microgliose e superexpressão do perfil DAM, além de reduzirem drasticamente a eficácia do tratamento com m-Aducanumab, o análogo murino de um anticorpo anti-A β atualmente aprovado para uso em humanos (62,180). Camundongos com vasculatura linfática restaurada e perfil de linfócitos modulado tiveram melhora em testes cognitivos. Isso indica que a modulação do sistema imune adaptativo pode ser um importante alvo terapêutico para modulação da DA, o que coloca os SCFAs em destaque, uma vez que estes são capazes de influenciar a diferenciação de linfócitos circulantes a partir do intestino.

Alterações cognitivas e comportamentais podem ser avaliadas em modelos experimentais, o que as torna muito informativa para doenças do SNC como a DA (147,181). Nesse sentido, dada a correlação entre disbiose intestinal e as disfunções cerebrais (182), estudos recentes focados na modulação da microbiota intestinal demonstraram o potencial dos metabólitos microbianos na modulação da cognição e do comportamento. Por meio de transplante de microbiota fecal é possível aliviar o acúmulo de A β , disfunção sináptica, neuroinflamação e déficits cognitivos observados em modelos transgênicos da DA (camundongos APP/PS1) (154). Similarmente, o tratamento de camundongos triplo-transgênicos para a DA (3xTg) com probióticos levou a redução de citocinas inflamatórias, dano tecidual e declínio cognitivo (183). Nesse sentido, os experimentos *in vivo* até o momento indicam que a suplementação com os SCFAs pode ser benéfica para o aprendizado e a memória, como visto nos testes de NOR e esQUIVA passiva, apresentando potencial neuroprotetor.

Além de alterações cognitivas, a DA apresenta como comorbidades transtornos emocionais como depressão e ansiedade, que também podem ser modulados pela composição da microbiota intestinal. Tendo em vista duas teorias da fisiopatologia da depressão, a deficiência de monoaminas (184) e o distúrbio da neurogênese (185), evidências clínicas mostram que a neuroinflamação e a redução nos níveis de SCFAs estão associados à ocorrência da doença (185–187). Em contrapartida, o tratamento com butirato apresenta efeitos antidepressivos que revertem sintomas comportamentais em camundongos (117,188–190). Nesse sentido, o teste do nado forçado mostrou que animais tratados com os SCFAs apresentaram menor comportamento do tipo-depressivo do que animais injetados com A β Os e não tratados. Esse resultado está de acordo com o padrão encontrado nos testes cognitivos. Já alterações de comportamento ansioso foram avaliadas nos testes de esconder esferas e de supressão alimentar pela novidade. O primeiro não demonstrou alterações em nenhum grupo. Já no teste da supressão alimentar, a maior diferença foi com relação à presença ou não da suplementação com SCFAs sem aparente associação com a injeção dos A β Os. Devido ao potencial dos SCFAs em modular também o metabolismo (191–193), fica difícil definir se os animais estavam de fato menos ansiosos ou apenas com mais fome, pois os grupos tratados comeram mais rápido na fase de teste e se alimentaram mais no pós-teste também.

Como discutido anteriormente, a disbiose intestinal tem sido relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças do SNC. Considerando as crescentes evidências sugerindo que os metabólitos microbianos exercem um papel central no eixo intestino-cérebro, para testar a hipótese que os SCFAs modulam os processos cognitivos realizamos um experimento onde a microbiota intestinal foi depletada e, posteriormente, os SCFAs suplementados na água de beber. Nossos resultados preliminares sugerem que a microbiota intestinal desempenha um papel importante para o aprendizado e a manutenção da memória dos animais. Paradoxalmente, sua ausência parece proteger contra o declínio cognitivo induzido pelos A β Os, de acordo com o teste de NOR. Por outro lado, animais depletados da microbiota e suplementados com SCFAs pareceram melhorar a memória de reconhecimento quando comparados com animais sem depleção da microbiota e suplementados com SCFAs.

Esse achado está de acordo com parte da literatura recente mostrando que a ausência da microbiota intestinal resulta na redução de biomarcadores das doenças de Alzheimer (194) e Parkinson (195). Uma possível explicação seria pelo perfil de maturação microglial que animais GF adquirem, o qual é caracterizado por aumento da quantidade e comprimento das ramificações e hiper responsividade a estímulos (96). Somado a isso, achados recentes mostram que a ativação microglial é importante nos estágios iniciais da DA, mas que tende a gerar um perfil hiper inflamatório a longo prazo (130). Dessa forma, é possível inferir que a microglia hiper-responsiva ao estímulo de A β pode apresentar uma boa resolução da doença no modelo murino, mas não foi testada na forma crônica em animais idosos. Ademais, animais GF apresentam alterações no sistema imune periférico que provavelmente podem se refletir na atividade microglial frente a um desafio. Entretanto, os mecanismos de controle da DA pelo sistema imune ainda não são completamente conhecidos, bem como os mecanismos que medeiam a conversa entre a microbiota intestinal e o SNC ainda permanece por ser elucidado.

Nossos resultados, ainda que preliminares, uma vez que o desenvolvimento experimental foi severamente afetado pela pandemia de COVID-19, sugerem que os SCFAs potencialmente exercem efeitos neuroprotetores frente ao processo neurodegenerativo induzido pelos A β Os. Dessa forma, mais estudos serão realizados para finalizar as análises comportamentais e determinar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito da suplementação com os SCFAs contra a toxicidade desencadeada pelos A β Os.

6. CONCLUSÕES PARCIAIS

Apesar de a literatura apresentar resultados conflitantes sobre a modulação da microbiota intestinal e alterações cognitivas na DA, o papel dos SCFAs na modulação de diversas funções biológicas, incluindo aquelas relacionadas a fisiologia cerebral, tem recebido considerável destaque nos últimos anos. Ainda que mais experimentos sejam necessários para compreender o papel dos SCFAs em nosso modelo, nossos resultados preliminares apontam que os SCFAs, principalmente o butirato, tem potencial promissor para modular a atividade da microglia e as alterações cognitivas desencadeadas pelos A β Os.

7. PERSPECTIVAS

Devido a pandemia de COVID-19, muitos experimentos planejados para esta dissertação foram severamente comprometidos. Por isso, ainda é necessário repetir os testes de comportamento e analisar a microscopia confocal em maior aumento para confirmação dos resultados obtidos neste projeto. Ainda assim, fomos capazes de publicar um artigo de revisão na revista *Frontiers in Endocrinology* intitulado “The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication” focado no assunto da dissertação dentro do prazo de execução do mestrado. Por fim, para aprofundar o conhecimento do papel dos SCFAs sobre o processo neuroinflamatório da DA eu darei continuidade ao projeto no doutorado com novos experimentos. Os novos objetivos para o projeto são:

1. Investigar o efeito dos SCFAs sobre a morfologia microglial e a neuroinflamação induzidas pelos A β Os;
2. Investigar o efeito dos SCFAs sobre a capacidade de fagocitose de A β Os pela microglia;
3. Investigar o efeito dos SCFAs sobre a toxicidade sináptica induzida pelos A β Os;
4. Investigar o efeito dos SCFAs sobre o perfil fenotípico de células T circulantes e infiltrantes no parênquima cerebral;
5. Investigar o papel de células T circulantes e infiltrantes no parênquima cerebral na mediação dos efeitos dos SCFAs sobre alterações comportamentais induzidas pelos A β Os.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8^a. Elsevier Health Sciences; 2017.
2. Lynch S V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. Vol. 375, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2016. p. 2369–79.
3. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015 3:1. 2015 Jul 30;3(1):1–3.
4. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès M-CC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020 8:1. 2020 Jun 30;8(1):1–22.
5. HMP THMC. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome The Human Microbiome Project Consortium HHS Public Access. *Nature*. 2013;486(7402):207–2014.
6. Cryan JF, O’Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu K V., Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*. 2019 Oct 1;99(4):1877–2013.
7. Cresci GA, Bawden E. Gut microbiome: What we do and don’t know. Vol. 30, *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc.; 2015. p. 734–46.
8. Russo R, Cristiano C, Avagliano C, De Caro C, La Rana G, Raso GM, et al. Gut-brain Axis: Role of Lipids in the Regulation of Inflammation, Pain and CNS Diseases. *Current medicinal chemistry*. 2018;25(32):3930–52.
9. Pascale A, Marchesi N, Marelli C, Coppola A, Luzi L, Govoni S, et al. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*. 2018;
10. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*. 2017;20(2):145–55.
11. Yoo BB, Mazmanian SK. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):910–26.
12. Palm NW, Zoete MR De, Flavell RA, Haven N. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clinical Immunology*. 2016;159(2):122–7.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 8th ed. Elsevier Health Sciences; 2014.
14. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. Vol. 13, *Nature Reviews Genetics*. 2012. p. 260–70.

15. Cani PD, Delzenne NM. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2009;15(13):1546–58.
16. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: An evolving relationship. *Gut*. 2014;63(9):1513–21.
17. Dillon SM, Frank DN, Wilson CC. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: A two-way street. Vol. 30, *AIDS*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 2737–51.
18. Liu Q, Li F, Zhuang Y, Xu J, Wang J, Mao X, et al. Alteration in gut microbiota associated with hepatitis B and non-hepatitis virus related hepatocellular carcinoma. *Gut Pathogens*. 2019 Jan 18;11(1):1–13.
19. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. Vol. 120, *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 1183–96.
20. Zhai C-D, Zheng J-J, An B-C, Huang H-F, Tan Z-C. Intestinal microbiota composition in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Chinese Medical Journal*. 2019;132(15):1815–22.
21. Li W, Wu X, Hu X, Wang T, Liang S, Duan Y, et al. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Science China Life sciences*. 2017 Nov;60(11):1223–33.
22. Seo DO, Holtzman DM. Gut microbiota: From the forgotten organ to a potential key player in the pathology of Alzheimer's disease. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2020;75(7):1232–41.
23. Sherwin E, Dinan TG, Cryan JF. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1420(1):5–25.
24. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. Vol. 167, *Cell*. Cell Press; 2016. p. 915–32.
25. Kim HL, Chang BJ, Nam SM, Nahm SS, Lee JH. Increased osteopontin expression and mitochondrial swelling in 3-nitropropionic acid-injured rat brains. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2017;58(4):1249–56.
26. Andersson U, Tracey KJ. Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2012 Apr 23;30(1):313–35.
27. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014;817:115–33.

28. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2019.
29. O’Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Vol. 277, *Behavioural Brain Research*. Elsevier; 2015. p. 32–48.
30. Smith PA. The tantalizing links between gut microbes and the brain. Vol. 526, *Nature*. England; 2015. p. 312–4.
31. Benakis C, Martin-Gallausiaux C, Trezzi JP, Melton P, Liesz A, Wilmes P. The microbiome-gut-brain axis in acute and chronic brain diseases. Vol. 61, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 1–9.
32. Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(4):241–55.
33. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive Diseases and Sciences*. 2012 Aug;57(8):2096–102.
34. Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. Cross talk: The microbiota and neurodevelopmental disorders. Vol. 11, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2017.
35. Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 2017 Mar;46(1):77–89.
36. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*. 2016 Mar 22;6(1):1–13.
37. Lauder AP, Roche AM, Sherrill-Mix S, Bailey A, Laughlin AL, Bittinger K, et al. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome*. 2016 Jun 23;4(1):1–11.
38. Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. Vol. 5, *Microbiome*. BioMed Central Ltd.; 2017. p. 1–19.
39. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*. 2015;6(263).

40. Russell SL, Gold MJ, Willing BP, Thorson L, McNagny KM, Finlay BB. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. *Gut Microbes*. 2013 Jan 27;4(2):158–64.
41. Tochitani S, Ikeno T, Ito T, Sakurai A, Yamauchi T, Matsuzaki H. Administration of Non-Absorbable Antibiotics to Pregnant Mice to Perturb the Maternal Gut Microbiota Is Associated with Alterations in Offspring Behavior. Shankar K, editor. *PLOS ONE*. 2016 Jan 20;11(1):e0138293.
42. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1762–75.
43. Foley KA, Ossenkopp K-P, Kavaliers M, MacFabe DF. Pre- and Neonatal Exposure to Lipopolysaccharide or the Enteric Metabolite, Propionic Acid, Alters Development and Behavior in Adolescent Rats in a Sexually Dimorphic Manner. Hashimoto K, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jan 22;9(1):e87072.
44. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. Vol. 353, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2016. p. 772–7.
45. Jašarević E, Rodgers AB, Bale TL. A novel role for maternal stress and microbial transmission in early life programming and neurodevelopment. Vol. 1, *Neurobiology of Stress*. Elsevier Inc; 2015. p. 81–8.
46. Kimura I, Miyamoto J, Ohue-Kitano R, Watanabe K, Yamada T, Onuki M, et al. Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice. *Science*. 2020;367(6481).
47. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Jun 29;107(26):11971–5.
48. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe*. 2015 May 13;17(5):690–703.
49. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Mar 15;108(SUPPL. 1):4578–85.

50. Borre YE, O’Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(9):509–18.
51. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. Vol. 9, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2012. p. 286–94.
52. De Vadder F, Grasset E, Holm LM, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018 Jun 19;115(25):6458–63.
53. Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert HJ, Clevers H, et al. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron*. 2015 Jan 21;85(2):289–95.
54. Browning KN, Verheijden S, Boeckxstaens GE. The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. Vol. 152, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2017. p. 730–44.
55. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*. 2012 Nov;10(11):735–42.
56. Khosravi A, Yáñez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS, et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host and Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):374–81.
57. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):485–98.
58. Faraco G, Brea D, Garcia-Bonilla L, Wang G, Racchumi G, Chang H, et al. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nature Neuroscience* 2017 21:2. 2018 Jan 15;21(2):240–9.
59. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-y M, et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*. 2013;341(August):569–74.
60. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, Van Der Veeken J, Deroos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451–5.

61. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Da Mesquita S, Wall M, Salvador AF, Smirnov I, et al. Meningeal $\gamma\delta$ T cells regulate anxiety-like behavior via IL-17a signaling in neurons. *Nature Immunology*. 2020;21(11):1421–9.
62. Da Mesquita S, Herz J, Wall M, Dykstra T, de Lima KA, Norris GT, et al. Aging-associated deficit in CCR7 is linked to worsened glymphatic function, cognition, neuroinflammation, and β -amyloid pathology. *Science Advances*. 2021 May 21;7(21):eabe4601.
63. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*. 2020 Jan 31;11(January):1–14.
64. Erny D, Hrabe de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*. 2015 Jul;18(7):965–77.
65. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *Journal of Physiology*. 2004 Jul 1;558(1):263–75.
66. Dinan TG, Quigley EMM, Ahmed SMM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, et al. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: Plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*. 2006 Feb 1;130(2):304–11.
67. Wu W-L, Adame MD, Liou C-W, Barlow JT, Lai T-T, Sharon G, et al. Microbiota regulate social behaviour via stress response neurons in the brain. *Nature*. 2021 Jun 30;1–6.
68. Mudd AT, Berding K, Wang M, Donovan SM, Dilger RN. Serum cortisol mediates the relationship between fecal *Ruminococcus* and brain N-acetylaspartate in the young pig. *Gut microbes*. 2017 Nov 2;8(6):589–600.
69. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*. 2012 Aug 1;113(2):411–7.
70. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature Microbiology*. 2019 Mar 1;4(3):396–403.
71. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. 2015 Apr 9;161(2):264–76.

72. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*. 2013 Jun;18(6):666–73.
73. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In: *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2014. p. 91–119.
74. Cummings JH, Pomare EW, Branch HWJ, Naylor CPE, MacFarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987;28(10):1221–7.
75. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. Vol. 70, *Physiological Reviews*. 1990. p. 567–90.
76. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003 Feb;62(1):67–72.
77. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 2017 Jan 8;19(1):29–41.
78. Smith EA, Macfarlane GT. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*. 1997;3(5):327–37.
79. Windey K, de Preter V, Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2012;56(1):184–96.
80. Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002 Oct 1;68(10):5186–90.
81. Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition*. 2004 Jun;91(6):915–23.
82. Stumpff F. A look at the smelly side of physiology: transport of short chain fatty acids. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2018 470:4. 2018 Jan 6;470(4):571–98.
83. Kekuda R, Manoharan P, Baseler W, Sundaram U. Monocarboxylate 4 mediated butyrate transport in a rat intestinal epithelial cell line. *Digestive Diseases and Sciences*. 2013 Mar;58(3):660–7.

84. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. <https://doi.org/101080/1949097620151134082>. 2016 May 3;7(3):189–200.
85. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. Vol. 57, *Journal of Lipid Research*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2016. p. 943–54.
86. Bloemen JG, Venema K, van de Poll MC, Olde Damink SW, Buurman WA, Dejong CH. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clinical Nutrition*. 2009 Dec 1;28(6):657–61.
87. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Acetic acid (HMDB0000042) [Internet]. [cited 2021 Jul 10]. Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000042>
88. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Propionic acid (HMDB0000237) [Internet]. [cited 2021 Jul 10]. Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000237>
89. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Butyric acid (HMDB0000039) [Internet]. [cited 2021 Jul 10]. Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000039>
90. Primec M, Mičetić-Turk D, Langerholc T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. Vol. 526, *Analytical Biochemistry*. Academic Press Inc.; 2017. p. 9–21.
91. Oldendorf WH. Carrier mediated blood brain barrier transport of short chain monocarboxylic organic acids. *American Journal of Physiology*. 1973;224(6):1450–3.
92. Vijay N, Morris M. Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain. *Current Pharmaceutical Design* Bentham Science Publishers Ltd.; Mar 25, 2014 p. 1487–98.
93. Bachmann C, Colombo JP, Berüter J. Short chain fatty acids in plasma and brain: Quantitative determination by gas chromatography. *Clinica Chimica Acta*. 1979 Mar 1;92(2):153–9.
94. Liu J, Sun J, Wang F, Yu X, Ling Z, Li H, et al. Neuroprotective Effects of *Clostridium butyricum* against Vascular Dementia in Mice via Metabolic Butyrate. *BioMed Research International*. 2015;2015:1–12.
95. Bolognini D, Tobin AB, Milligan G, Moss CE. The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids. *Molecular Pharmacology* [Internet]. 2016 Mar 1

[cited 2019 Oct 19];89(3):388–98. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.115.102301>

96. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*. 2015 Jul;18(7):965–77.
97. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*. 2014 Jan;156(1–2):84–96.
98. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, et al. GPR109A Is a G-protein–Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon. *Cancer Research*. 2009 Apr 1;69(7):2826–32.
99. Priori D, Colombo M, Clavenzani P, Jansman AJM, Lallès J-P, Trevisi P, et al. The Olfactory Receptor OR51E1 Is Present along the Gastrointestinal Tract of Pigs, Co-Localizes with Enteroendocrine Cells and Is Modulated by Intestinal Microbiota. *PLOS ONE*. 2015 Jun 15;10(6):e0129501.
100. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Mar 12;110(11):4410–5.
101. Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*. 2016;99:110–32.
102. Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008 Sep 1;19(9):587–93.
103. Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*. 2016 Apr 1;5(4):e73.
104. Rodrigues HG, Takeo Sato F, Curi R, Vinolo MAR. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *European Journal of Pharmacology*. 2016 Aug 15;785:50–8.
105. Cherbut C, Ferrier L, Rozé C, Anini Y, Blottière H, Lecannu G, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat.

- American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 1998;275(6 38-6).
106. Puddu A, Sanguineti R, Montecucco F, Viviani GL. Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes. Vol. 2014, Mediators of Inflammation. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
 107. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity* 2015 39:9. 2015 May 14;39(9):1331–8.
 108. Byrne CS, Chambers ES, Alhabeed H, Chhina N, Morrison DJ, Preston T, et al. Increased colonic propionate reduces anticipatory reward responses in the human striatum to high-energy foods. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2016;104(1):5–14.
 109. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology and Motility*. 2011 Dec;23(12):1132–9.
 110. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*. 2014 Apr 29;5:3611.
 111. Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF, La Gamma EF. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells - Possible relevance to autism spectrum disorders. *PLoS ONE*. 2014 Aug 29;9(8).
 112. Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016 Aug 1;56:140–55.
 113. Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Amboni RT, et al. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *Journal of Psychiatric Research*. 2015 Feb 1;61:114–21.
 114. Intlekofer KA, Berchtold NC, Malvaez M, Carlos AJ, McQuown SC, Cunningham MJ, et al. Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Sep;38(10):2027–34.

115. Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *Journal of Neurochemistry*. 2009 Aug;110(4):1226–40.
116. Yoo DY, Kim W, Nam SM, Kim DW, Chung JY, Choi SY, et al. Synergistic effects of sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on increase of neurogenesis induced by pyridoxine and increase of neural proliferation in the mouse dentate gyrus. *Neurochemical Research*. 2011 Oct;36(10):1850–7.
117. Wei Y Bin, Melas PA, Wegener G, Mathe AA, Lavebratt C. Antidepressant-like effect of sodium butyrate is associated with an increase in tet1 and in 5-hydroxymethylation levels in the BDNF gene. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2015 Jan 1;18(2):1–10.
118. Wilton DK, Dissing-Olesen L, Stevens B. Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annual Review of Neuroscience* [Internet]. 2019 Jul 8 [cited 2019 Oct 26];42(1):107–27. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-070918-050306>
119. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 2016 May 6;352(6286):712–6.
120. Patnala R, Arumugam T V, Gupta N, Dheen ST. HDAC Inhibitor Sodium Butyrate-Mediated Epigenetic Regulation Enhances Neuroprotective Function of Microglia During Ischemic Stroke. *Molecular neurobiology*. 2017 Oct;54(8):6391–411.
121. Stanisavljević S, Čepić A, Bojić S, Veljović K, Mihajlović S, Đedović N, et al. Oral neonatal antibiotic treatment perturbs gut microbiota and aggravates central nervous system autoimmunity in Dark Agouti rats. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–13.
122. Minter MR, Zhang C, Leone V, Ringus DL, Zhang X, Oyler-Castrillo P, et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer’s disease. *Scientific Reports*. 2016 Sep 21;6(1):30028.
123. Minter MR, Hinterleitner R, Meisel M, Zhang C, Leone V, Zhang X, et al. Antibiotic-induced perturbations in microbial diversity during post-natal development alters amyloid pathology in an aged APP SWE /PS1 ΔE9 murine model of Alzheimer’s disease. *Scientific Reports*. 2017 Dec 1;7(1).

124. Wang P, Zhang Y, Gong Y, Yang R, Chen Z, Hu W, et al. Sodium butyrate triggers a functional elongation of microglial process via Akt-small RhoGTPase activation and HDACs inhibition. *Neurobiology of Disease*. 2018;111(November 2017):12–25.
125. Soliman ML, Puig KL, Combs CK, Rosenberger TA. Acetate reduces microglia inflammatory signaling *in vitro*. *Journal of Neurochemistry* [Internet]. 2012 Nov;123(4):555–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2012.07955.x>
126. Soliman ML, Combs CK, Rosenberger TA. Modulation of Inflammatory Cytokines and Mitogen-activated Protein Kinases by Acetate in Primary Astrocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* [Internet]. 2013 Mar 12;8(1):287–300. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11481-012-9426-4>
127. World Health Organization. Dementia [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
128. Alzheimer's Disease International. Numbers of people with dementia worldwide [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 8]. Available from: <https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide/>
129. Associação Brasileira de Alzheimer. O que é Alzheimer [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 8]. Available from: <https://abraz.org.br/2020/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer-2/>
130. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019;179(2):312–39.
131. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012 May 1;2(5):a006270.
132. Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstål H. Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie*. 2017 Sep 1;140:176–92.
133. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. Perry G, Avila J, Moreira PI, Sorensen AA, Tabaton M, editors. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018 Jun;64(s1):S567–610.
134. Ferreira ST, Lourenco M v., Oliveira MM, de Felice FG. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9(MAY):1–17.
135. Ferreira ST, Lourenco M v., Oliveira MM, de Felice FG. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. Vol. 9, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2015.

136. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984 May 16;120(3):885–90.
137. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995;376(6543):775–8.
138. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*. 1991;353(6347):844–6.
139. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2011 Jun 29 [cited 2020 Sep 2];3(89):89ra57-89ra57. Available from: www.ScienceTranslationalMedicine.org
140. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Mar 17];8(6):595–608. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.15252/emmm.201606210>
141. Heneka MT, McManus RM, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2018 Oct;19(10):610–21.
142. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. Vol. 396, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2020. p. 413–46.
143. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921–3.
144. Montagne A, Nation DA, Sagare AP, Barisano G, Sweeney MD, Chakhoyan A, et al. APOE4 leads to blood–brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *Nature*. 2020;581(7806):71–6.
145. Villegas-Llerena C, Phillips A, Reitboeck PG, Hardy J, Pocock JM. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 2016;36:74–81.
146. Scheiblich H, Trombly M, Ramirez A, Heneka MT. Neuroimmune Connections in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Trends in immunology*. 2020 Apr;41(4):300–12.

147. Deczkowska A, Schwartz M. Targeting neuro-immune communication in neurodegeneration: Challenges and opportunities. *The Journal of experimental medicine*. 2018 Nov;215(11):2702–4.
148. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*. 2018 May;173(5):1073–81.
149. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* [Internet]. 2017 Jan 26 [cited 2020 Sep 2];541(7638):481–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature21029>
150. Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J. The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron*. 2018 Oct;100(2):375–88.
151. Da Mesquita S, Herz J, Wall M, Dykstra T, de Lima KA, Norris GT, et al. Aging-associated deficit in CCR7 is linked to worsened glymphatic function, cognition, neuroinflammation, and β -amyloid pathology. *Science Advances*. 2021;7(21):1–18.
152. Tarawneh R, Holtzman DM. Biomarkers in translational research of Alzheimer’s disease. *Neuropharmacology*. 2010;59(4–5):310–22.
153. Frozza RL, Lourenco M V., de Felice FG. Challenges for Alzheimer’s disease therapy: Insights from novel mechanisms beyond memory defects. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12(FEB):1–13.
154. Aducanumab Approved for Treatment of Alzheimer’s | alz.org [Internet]. [cited 2021 Jul 31]. Available from: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/aducanumab>
155. GV-971 | ALZFORUM [Internet]. [cited 2021 Jul 31]. Available from: <https://www.alzforum.org/therapeutics/gv-971>
156. Zhuang Z-Q, Shen L-L, Li W-W, Fu X, Zeng F, Gui L, et al. Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2018 Jan 1;63(4):1337–46.
157. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer’s disease. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017 Oct 19;7(1):1–11.
158. Zhang L, Wang Y, Xiayu X, Shi C, Chen W, Song N, et al. Altered Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2017;60(4):1241–57.

159. Harach T, Marungruang N, Duthilleul N, Cheatham V, Coy KDM, Frisoni G, et al. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017 Feb 8;7(1):1–15.
160. Sun J, Xu J, Ling Y, Wang F, Gong T, Yang C, et al. Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Translational Psychiatry*. 2019 Dec 5;9(1):189.
161. Wang X, Sun G, Feng T, Zhang J, Huang X, Wang T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Research*. 2019 Oct;29(10):787–803.
162. van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, Wiley N, Strain C, O'Sullivan O, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain–gut axis alterations. *Journal of Physiology*. 2018;596(20):4923–44.
163. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 May;95(11):6448–53.
164. CONCEA. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. 1^a. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; 2019.
165. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*. 1991;37(2):173–82.
166. Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, Caroni P. Staining protocol for organotypic hippocampal slice cultures. *Nature Protocols*. 2006 Dec 29;1(5):2452–6.
167. Lourenco M V., Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF, et al. TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metabolism*. 2013 Dec 3;18(6):831–43.
168. Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *Journal of Pharmacological Methods*. 1986 Dec 1;16(4):355–7.

169. Chu C, Murdock MH, Jing D, Won TH, Chung H, Kressel AM, et al. The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. *Nature*. 2019 Oct 24;574(7779):543–8.
170. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013;8(12):2531–7.
171. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(82):1–7.
172. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;(97):1–7.
173. Augusto CAMF. Butirato de sódio como um potencial agente neuroprotetor em modelo experimental da doença de Alzheimer [Internet]. 2017. Available from: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/25145/2/camila_augusto_ioc_mest_2017.pdf
174. Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, et al. Inhibitors of Class 1 Histone Deacetylases Reverse Contextual Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Neuropsychopharmacology* 2010 35:4 [Internet]. 2009 Dec 9 [cited 2022 Mar 18];35(4):870–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/npp2009197>
175. Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, Sananbenesi F, Fischer A. Sodium butyrate improves memory function in an alzheimer’s disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2011;26(1):187–97.
176. Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*. 2016 Oct;99:110–32.
177. Chen T, Noto D, Hoshino Y, Mizuno M, Miyake S. Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1):165.
178. Hoyles L, Snelling T, Umlai U-K, Nicholson JK, Carding SR, Glen RC, et al. Microbiome-host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood-brain barrier. *Microbiome*. 2018 Mar;6(1):55.
179. Gautiar EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*. 2012 Nov;13(11):1118–28.

180. Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, et al. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Research*. 2018;1680:13–38.
181. Mathys H, Adaikkan C, Gao F, Young JZ, Manet E, Hemberg M, et al. Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Reports*. 2017 Oct 10;21(2):366–80.
182. Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, Gao F, Mohammadi S, Young JZ, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer’s disease. *Nature*. 2019;570(7761):332–7.
183. Zhao Y, Wu X, Li X, Jiang L-L, Gui X, Liu Y, et al. TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron*. 2018 Mar;97(5):1023-1031.e7.
184. Huang Y, Happonen KE, Burrola PG, O’Connor C, Hah N, Huang L, et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nature Immunology* 2021 22:5. 2021 Apr 15;22(5):586–94.
185. Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1416.
186. Datta M, Staszewski O, Raschi E, Frosch M, Hagemeyer N, Tay TL, et al. Histone Deacetylases 1 and 2 Regulate Microglia Function during Development, Homeostasis, and Neurodegeneration in a Context-Dependent Manner. *Immunity*. 2018 Mar 20;48(3):514-529.e6.
187. Wendeln AC, Degenhardt K, Kaurani L, Gertig M, Ulas T, Jain G, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*. 2018 Apr 19;556(7701):332–8.
188. Reddy DS, Wu X, Golub VM, Dashwood WM, Dashwood RH. Measuring Histone Deacetylase Inhibition in the Brain. *Current Protocols in Pharmacology*. 2018 Jun 1;81(1).
189. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. Macrophage/Microglia-specific Protein Iba1 Enhances Membrane Ruffling and Rac Activation via Phospholipase C- γ -dependent Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 May 31;277(22):20026–32.
190. Da Mesquita S, Papadopoulos Z, Dykstra T, Brase L, Farias FG, Wall M, et al. Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-A β immunotherapy. *Nature*. 2021;593(7858):255–60.
191. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo:

- evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human Molecular Genetics*. 2004 Jan 15;13(2):159–70.
192. Hill JM, Bhattacharjee S, Pogue AI, Lukiw WJ. The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*. 2014;5 APR.
 193. Bonfili L, Cecarini V, Berardi S, Scarpona S, Suchodolski JS, Nasuti C, et al. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–21.
 194. Delgado PL. Depression: The case for a monoamine deficiency. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2000;61(Suppl 6):7–11.
 195. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 22–34.
 196. Skonieczna-żydecka K, Grochans E, Maciejewska D, Szkup M, Schneider-Matyka D, Jurczak A, et al. Faecal short chain fatty acids profile is changed in Polish depressive women. *Nutrients*. 2018 Dec 1;10(12).
 197. Szczesniak O, Hestad KA, Hanssen JF, Rudi K. Isovaleric acid in stool correlates with human depression. *Nutritional Neuroscience*. 2016 Aug 8;19(7):279–83.
 198. Valvassori S, Resende W, Budni J, Dal-Pont G, Bavaresco D, Reus G, et al. Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Reverses Behavioral and Mitochondrial Alterations in Animal Models of Depression Induced by Early- or Late-life Stress. *Current Neurovascular Research*. 2015;12(4):312–20.
 199. Sun J, Wang F, Hong G, Pang M, Xu H, Li H, et al. Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience letters*. 2016 Apr 8;618:159–66.
 200. Burokas A, Arbolea S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biological Psychiatry*. 2017;82(7):472–87.
 201. Torres-Fuentes C, Golubeva A V., Zhdanov A V., Wallace S, Arbolea S, Papkovsky DB, et al. Short-chain fatty acids and microbiota metabolites attenuate ghrelin receptor signaling. *The FASEB Journal*. 2019 Sep 21;fj.201901433R.
 202. Miletta MC, Petkovic V, Eblé A, Ammann RA, Flück CE, Mullis PE. Butyrate increases intracellular calcium levels and enhances growth hormone release from rat anterior

- pituitary cells via the G-protein-coupled receptors GPR41 and 43. PLoS ONE. 2014;9(10).
203. Marosi K, Kim SW, Moehl K, Scheibye-Knudsen M, Cheng A, Cutler R, et al. 3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *Journal of neurochemistry*. 2016 Dec;139(5):769–81.
204. Dodiya HB, Kuntz T, Shaik SM, Baufeld C, Leibowitz J, Zhang X, et al. Sex-specific effects of microbiome perturbations on cerebral A β amyloidosis and microglia phenotypes. *The Journal of Experimental Medicine*. 2019;jem.20182386.
205. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016 Dec;167(6):1469-1480.e12.

9. ANEXO I: Artigo de revisão publicado durante o período do mestrado



The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication

Ygor Parladore Silva¹, Andressa Bernardi² and Rudimar Luiz Frozza^{1*}

¹Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratory of Inflammation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Rosa Pérez,
National Council for Scientific and
Technical Research
(CONICET), Argentina

Reviewed by:

Claude Knauf,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
(INSERM), France
Douglas Morrison,
University of Glasgow,
United Kingdom
Norbert Sprenger,
Nestlé Institute of Health Sciences
(NIHS), Switzerland

*Correspondence:

Rudimar Luiz Frozza
rudimar.frozza@ioc.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 31 October 2019

Accepted: 14 January 2020

Published: 31 January 2020

Citation:

Silva YP, Bernardi A and Frozza RL
(2020) The Role of Short-Chain Fatty
Acids From Gut Microbiota in
Gut-Brain Communication.
Front. Endocrinol. 11:25.
doi: 10.3389/fendo.2020.00025

A substantial body of evidence supports that the gut microbiota plays a pivotal role in the regulation of metabolic, endocrine and immune functions. In recent years, there has been growing recognition of the involvement of the gut microbiota in the modulation of multiple neurochemical pathways through the highly interconnected gut-brain axis. Although amazing scientific breakthroughs over the last few years have expanded our knowledge on the communication between microbes and their hosts, the underpinnings of microbiota-gut-brain crosstalk remain to be determined. Short-chain fatty acids (SCFAs), the main metabolites produced in the colon by bacterial fermentation of dietary fibers and resistant starch, are speculated to play a key role in neuro-immunoendocrine regulation. However, the underlying mechanisms through which SCFAs might influence brain physiology and behavior have not been fully elucidated. In this review, we outline the current knowledge about the involvement of SCFAs in microbiota-gut-brain interactions. We also highlight how the development of future treatments for central nervous system (CNS) disorders can take advantage of the intimate and mutual interactions of the gut microbiota with the brain by exploring the role of SCFAs in the regulation of neuro-immunoendocrine function.

Keywords: central nervous system, neuroinflammation, gut-brain axis, gut microbiota, short-chain fatty acids

INTRODUCTION

The human body is inhabited by a wide variety of commensal microorganisms collectively called the microbiota. This host microbiota colonizes the skin and several mucosal cavities (nasal, oral, pulmonary, and vaginal); however, it is in the gastrointestinal (GI) tract that these organisms reach extraordinary densities since trillions of bacteria, fungi, and viruses coexist in symbiosis with the host for potential mutual benefit (1–3). Despite its significant influence on the state of human health and the development or progression of diseases, it is only in the last 20 years that our gut microbiota has become the focus of intense studies. Therefore, its pivotal roles in protecting against pathogens, regulating metabolic, endocrine, and immune functions and in influencing drug metabolism and absorption have started to be elucidated (4, 5). Further, it was recently unveiled that the influence of the microbiota is not restricted to the GI tract; it plays a major role in the bidirectional communication between the GI tract and the central nervous system (CNS). The growing body of evidence indicating that the gut microbiota exerts a profound influence on key brain processes has led to the development of the microbiota-gut-brain axis concept, which has attracted the interest of researchers worldwide (6–11).

Although the precise mechanisms involved in the crosstalk between the gut microbiota and brain remain to be fully determined, there are a number of potential pathways through which the gut microbiota can influence brain function (9). Microorganisms can influence CNS processes bidirectionally via the vagus nerve (12) and through modulation of the immune system (6), the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (13, 14), and tryptophan metabolism (15), along with their ability to synthesize a number of neurotransmitters (16–18) and produce metabolites, such as short-chain fatty acids (SCFAs), that possess neuroactive properties (17, 19–21).

The SCFAs acetate, propionate, and butyrate are the main metabolites produced in the colon by bacterial fermentation of dietary fibers and resistant starch (22). In addition to the long-known role of the colon in energy supply and trophic factors (22), as well as the regulation of T regulatory (Treg) cell colonies (23, 24), growing evidence supports the idea that SCFAs also exert crucial physiological effects on several organs, including the brain (17, 20, 21). This hypothesis is supported by studies in animals and humans showing that gut microbiota dysbiosis has been implicated in behavioral and neurologic pathologies, such as depression, Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases and autism spectrum disorder (ASD) (9, 21, 25–27). Furthermore, microbiota manipulation and SCFA administration have been proposed as treatment targets for such diseases (28).

In this review, we outline the current knowledge about the involvement of acetate, propionate, and butyrate in microbiota-gut-brain interactions. We also highlight how the development of future treatments for CNS disorders can take advantage of the intimate and mutual interactions of the gut microbiota with the brain by exploring the role of SCFAs in the regulation of neuro-immunoendocrine function.

THE MICROBIOTA-GUT-BRAIN AXIS

The modulation of gut physiology by the CNS and its effects on gut function such as motility, secretion, blood flow, nociception, and immune function during neurological stressors are well-documented (17, 29, 30). Further, brain to gut signaling can directly affect the microbiota, either via immune system or gut functions such as motility, release of neurotransmitters and intestinal immune tone (12, 17, 21, 31). Comparatively, gut to CNS signaling has been studied for a short period, and

the mechanisms underlying this crosstalk are starting to be understood (13, 32). It is noteworthy that several brain disorders have been linked to imbalances in the microbial composition of the gut (17, 19, 29, 33–37); however, whether these alterations in the microbiota are induced by brain signaling or whether brain dysfunction is driven by changes in the gut microbiota remains to be fully determined.

Although a more compelling causal relationship between altered gut microbial composition and brain dysfunction is still needed, it has been shown that disruption in the neuronal and microbial organization in prenatal and postnatal periods of mammalian development may lead to the onset of neurodevelopmental and other brain disorders later in life (9, 38–40). In a similar way, growing evidence has shown that alterations in maternal microbiome during pregnancy, such as use of antibiotics or probiotics (41, 42), variations in diet (43), immune activation (44, 45), and exposure to stress (46) can modulate the microbiome, neurodevelopment, and behavior of offspring in both rodents and humans (9, 29). Furthermore, delivery mode (47) and early-life occurrences such as feeding changes, infection, and antibiotics treatment (48, 49) have a huge effect on the gut microbiota composition with a long-term impact on brain and behavior (9, 29).

Under physiological conditions, activation of immune cells and production of cytokines can have a minor impact in the CNS. However, chronic systemic inflammation, mostly in the form of infections, has long been associated with behavioral alterations and cognitive dysfunction (50, 51). It is now widely known that peripheral insults that cause a systemic inflammatory response might affect ongoing inflammation in the CNS mainly by microglial activation, production of inflammatory molecules, as well as recruitment of peripheral immune cells into the brain, thus shaping a cerebral inflammatory milieu that may seriously affect neuronal function (50, 52, 53). Noteworthy, during gut pathologies with increased permeability of the intestinal barrier, the translocation of bacterial products can increase the production of cytokines and impact the blood-brain barrier (BBB), leading to more intense harmful effects (37). Further, it has already been shown that several bacterial strains can modify levels of neurotransmitter precursors in the gut lumen and even independently synthesize (or modulate the synthesis of) a number of neurotransmitters, including γ -aminobutyric acid (GABA), serotonin (5-HT), dopamine (DA), and noradrenaline (NA) (16–18). These neurotransmitters can potentially influence microglial activation and several cerebral functions (54). Additionally, the sympathetic branch of the autonomic nervous system is also involved in intestinal homeostasis and immune regulation (30). Conversely, the gut microbiota can interact with the CNS via gut modulation or directly via metabolites and endotoxin translocation from the lumen to the circulation (9, 17, 21). Possible signal transducers involved in the communication of the microbiota with the CNS include enterochromaffin cells, which can bind several microbial products and secrete serotonin into the lamina propria, increasing colonic and blood concentrations of 5-HT (55, 56). Gut-brain communication can also be achieved through vagus nerve signaling (57). Changes in enteric neuron activity perceived

Abbreviations: β , amyloid- β peptide; AD, Alzheimer's disease; ASD, autism spectrum disorder; α Syn, α -synuclein; BBB, blood-brain barrier; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BHB, β -hydroxybutyrate; CNS, central nervous system; DA, dopamine; EAE, experimental autoimmune encephalopathy; FFAR, free fatty acid receptor; FMT, fecal microbiota transplantation; GABA, γ -aminobutyric acid; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GF, germ free; GH, growth hormone; GI, gastrointestinal (tract); GLP-1, glucagon-like peptide 1; GOS, galacto-oligosaccharides; GPCR, G protein-coupled receptors; HCAR2, hydrocarboxylic acid receptor; HDACs, histone deacetylases; HDACi, HDAC inhibitor; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; LPS, lipopolysaccharide; MCT, H^+ -coupled monocarboxylate transporter; MS, multiple sclerosis; NA, noradrenaline; NGE, nerve growth factor; PD, Parkinson's disease; PKC δ , protein kinase C δ ; PYY, peptide YY; 5-HT, serotonin; SCFAs, short-chain fatty acids; SMCTs, sodium-coupled monocarboxylate transporters; SPF, specific pathogen-free; Tregs, T-regulatory lymphocytes.

by the vagus nerve are essential for mediating satiety, stress, and mood (12, 58, 59). Given the close physical proximity, gut bacteria can interact with and activate the vagus nerve, thereby exerting effects upstream to the CNS. This notion is in full accordance with early studies showing that oral inoculation with pathogens or probiotics induces activation of the vagal sensory neurons that innervate the GI affecting the regulation of CNS functions, and this effect is absent in vagotomized mice (32, 58, 60). However, whether the vagus nerve is activated by physical interaction with bacteria or through soluble microbial components remain to be determined.

Finally, bacterial metabolic byproducts including SCFAs are often considered key candidate mediators of gut-brain communication, and altered SCFA production has been demonstrated in a variety of neuropathologies (19, 21, 33–35).

METABOLISM AND PERIPHERAL EFFECTS OF SCFAS

SCFAs are small organic monocarboxylic acids with a chain length of up to six carbons atoms and are the main products of the anaerobic fermentation of indigestible polysaccharides such as dietary fiber and resistant starch produced by the microbiota in the large intestine (61, 62). Comprised mostly of acetate (C2), propionate (C3), and butyrate (C4) (63, 64) in an approximate molar rate of 60:20:20, respectively (65), approximately 500–600 mmol of SCFAs are produced in the gut per day depending on the fiber content in the diet, microbiota composition, and gut transit time (66, 67). Although anaerobic fermentation of fibers is the largest source of SCFAs, acetate, propionate, and butyrate can also be produced from amino acid metabolism (68). However, less than 1% of the large intestine microbiota uses these metabolic pathways to produce SCFAs (69, 70). Protein fermentation usually takes place in the distal large intestine where carbohydrates are already depleted and also leads to the production of potentially toxic metabolites, such as ammonia, phenols, and sulfides, as well as unique branched-chain fatty acids (BCFA) (69, 71). Further, acetate produced from acetyl-CoA derived from glycolysis can also be transformed into butyrate by the enzyme butyryl-CoA:acetyl-CoA transferase (72, 73), and bovine milk fats also provide a source of butyrate (74).

Following their production, SCFAs are absorbed by colonocytes, mainly via H⁺-dependent or sodium-dependent monocarboxylate transporters (MCTs and SMCTs, respectively) (75). MCTs show different subtypes and expression patterns in different tissues. SCFAs that are not metabolized in the colonocytes are transported into the portal circulation and are used as an energy substrate for hepatocytes (76), except for acetate that is not oxidized in the liver (76). Therefore, only a minor fraction of colon-derived acetate, propionate, and butyrate reaches the systemic circulation and other tissues (65). In this context, it is important to note that most of the recent works regarding microbial-derived SCFA, mainly in human studies, use fecal concentrations as a proxy of the production in the colon (17, 19, 29, 33–37). Although it represents a valid approach, there are many potential sources of bias, such as

intestinal transit and permeability, metabolite transportation, and sample handling (77). Thus, these drawbacks must be taken into account when concluding the effects of administered SCFAs, given that some experiments might be conducted under non-physiological conditions.

SCFAs improve the gut health through a number of local effects, ranging from maintenance of intestinal barrier integrity, mucus production, and protection against inflammation to reduction of the risk of colorectal cancer (78–81). Although a thorough comprehension of signaling triggered by SCFAs is still lacking, it is already known that SCFAs bind to G protein-coupled receptors (GPCRs). The best-studied SCFA receptors are GPR43 and GPR41, later renamed free fatty acid receptor (FFAR2) and FFAR3, as well as GPR109a/HCAR2 (hydrocarboxylic acid receptor) and GPR164, which are expressed in a vast array of cells, from the gastrointestinal mucosa to the immune and nervous systems (82, 83). The effects of activation of these receptors differ greatly depending on the cell on which they are expressed. For instance, binding of SCFAs to their receptors on enteroendocrine cells results in stimulated secretion of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) (84), while signaling in β -pancreatic cells leads to increased insulin secretion (85).

Another mechanism by which SCFAs regulate systemic functions is through the inhibition of histone deacetylase (HDAC) activity, thus promoting the acetylation of lysine residues present in nucleosomal histones throughout various cell populations (20). This intracellular signaling mechanism has been found in both the gut and associated immune tissue (86), as well as in the peripheral nervous system and CNS (20).

Although only a minor fraction of colon-derived SCFAs reaches the systemic circulation and other tissues, their effects on different organ and systems have recently been widely outlined. One of the best-documented effects of SCFAs is on the immune system since butyrate is capable of inducing Treg differentiation and controlling inflammation (17, 23, 24, 87). Although fine-tuning of the gut immune response to the microbiota is still a matter of debate, microbiota metabolites are capable of alleviating or worsening gut conditions such as inflammatory bowel disease (88). Effects on brown adipose tissue activation (89), regulation of liver mitochondrial function (90), whole-body energy homeostasis (91), and control of appetite (89) and sleep (10) have been attributed to all SCFAs. Further, the influence of the microbiota and the effects of SCFAs on the CNS have been a matter of intense debate in the last few years.

SCFAS AND THE BRAIN

In addition to exerting local effects in the colon and in the peripheral tissues, SCFAs are speculated to play a pivotal role in microbiota-gut-brain crosstalk (Figure 1). The abundant expression of MCTs in endothelial cells (75, 92) might facilitate crossing of the BBB by SCFAs since brain uptake of SCFAs has previously been demonstrated in rats following injection of ¹⁴C-SCFAs into the carotid artery (93). Although studies on physiological concentrations of SCFAs in the brain are scarce, all three metabolites are detectable in the human cerebrospinal fluid (CSF), typically in the range of 0–171 μ M for acetate,

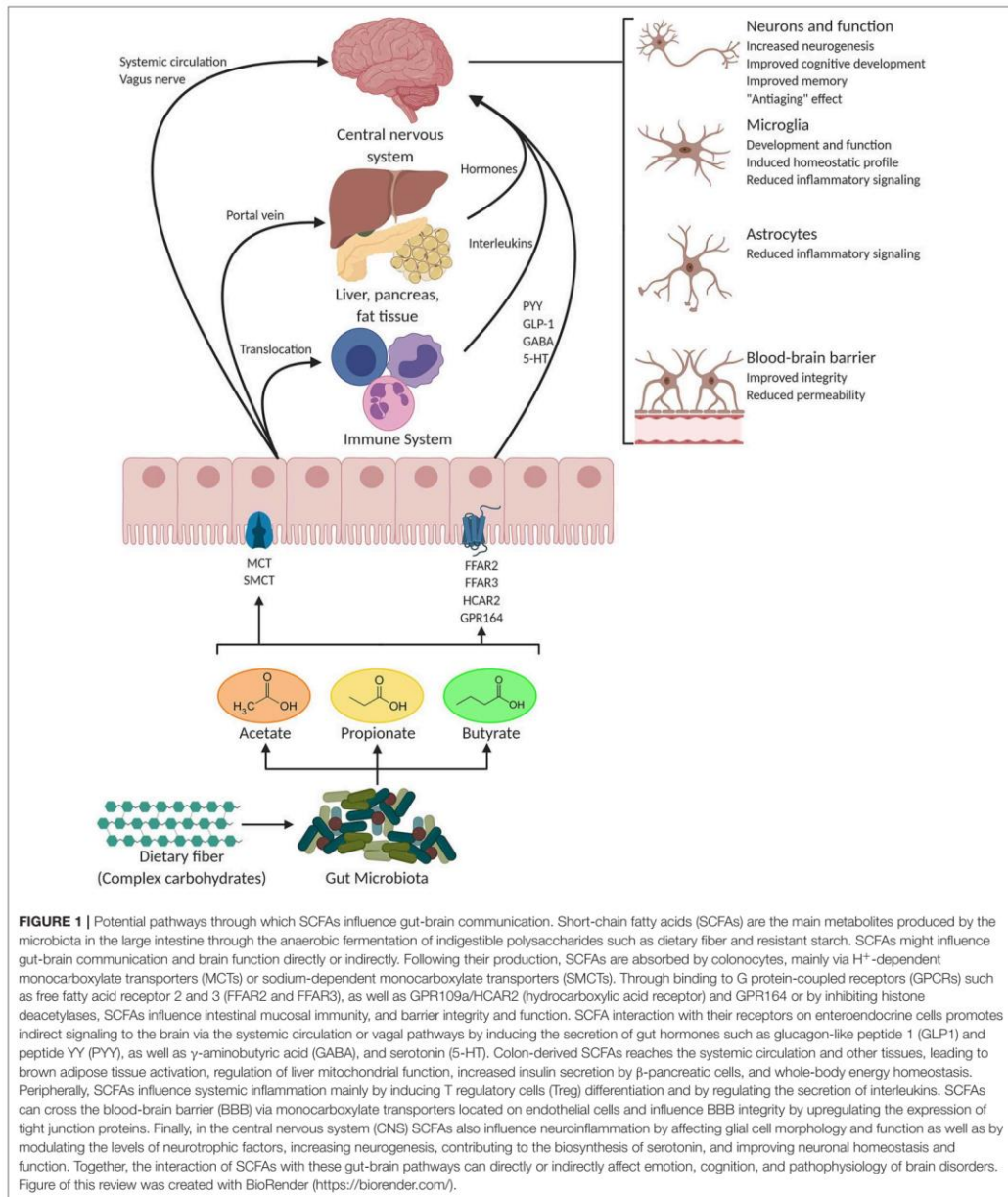


FIGURE 1 | Potential pathways through which SCFAs influence gut-brain communication. Short-chain fatty acids (SCFAs) are the main metabolites produced by the microbiota in the large intestine through the anaerobic fermentation of indigestible polysaccharides such as dietary fiber and resistant starch. SCFAs might influence gut-brain communication and brain function directly or indirectly. Following their production, SCFAs are absorbed by colonocytes, mainly via H⁺-dependent monocarboxylate transporters (MCTs) or sodium-dependent monocarboxylate transporters (SMCTs). Through binding to G protein-coupled receptors (GPCRs) such as free fatty acid receptor 2 and 3 (FFAR2 and FFAR3), as well as GPR109a/HCAR2 (hydrocarboxylic acid receptor) and GPR164 or by inhibiting histone deacetylases, SCFAs influence intestinal mucosal immunity, and barrier integrity and function. SCFA interaction with their receptors on enteroendocrine cells promotes indirect signaling to the brain via the systemic circulation or vagal pathways by inducing the secretion of gut hormones such as glucagon-like peptide 1 (GLP1) and peptide YY (PYY), as well as γ -aminobutyric acid (GABA), and serotonin (5-HT). Colon-derived SCFAs reaches the systemic circulation and other tissues, leading to brown adipose tissue activation, regulation of liver mitochondrial function, increased insulin secretion by β -pancreatic cells, and whole-body energy homeostasis. Peripherally, SCFAs influence systemic inflammation mainly by inducing T regulatory cells (Treg) differentiation and by regulating the secretion of interleukins. SCFAs can cross the blood-brain barrier (BBB) via monocarboxylate transporters located on endothelial cells and influence BBB integrity by upregulating the expression of tight junction proteins. Finally, in the central nervous system (CNS) SCFAs also influence neuroinflammation by affecting glial cell morphology and function as well as by modulating the levels of neurotrophic factors, increasing neurogenesis, contributing to the biosynthesis of serotonin, and improving neuronal homeostasis and function. Together, the interaction of SCFAs with these gut-brain pathways can directly or indirectly affect emotion, cognition, and pathophysiology of brain disorders. Figure of this review was created with BioRender (<https://biorender.com/>).

0–6 μ M for propionate, and 0–2.8 μ M for butyrate (94). An average concentration of 17.0 pmol/mg of tissue for butyrate and 18.8 pmol/mg of tissue for propionate in the human brain

was reported (95). Furthermore, the levels of butyrate in the brain of mice supplemented with live *Clostridium butyricum* reached a range from 0.4 to 0.7 μ mol/g, which was about

an order of magnitude higher than concentrations reported in peripheral blood (96, 97). In addition to crossing BBB, SCFAs seem to play an important role in maintaining its integrity, which is tightly associated with controlled passage of molecules and nutrients from the circulation to the brain, playing a central role in brain development and the preservation of CNS homeostasis. Supporting the notion that SCFAs regulate the BBB function, germ-free (GF) mice show reduced expression of tight junction proteins such as claudin and occludin, leading to increased permeability of the BBB from intrauterine life to adulthood (98). Furthermore, recolonization of these adult mice with a complex microbiota or monocolonization with SCFA-producing bacterial strains recovers the integrity of the BBB (98). Similarly, treatment of an *in vitro* model of cerebrovascular endothelial cells with propionate attenuates the permeabilizing effects of exposure to lipopolysaccharide (LPS) (99).

Accumulating evidence suggests that SCFAs that cross into the CNS have neuroactive properties. Although the precise mechanisms involved in the action of SCFAs on the CNS remain largely unknown, a multitude of animal studies have shown that they exert widespread influence on key neurological and behavioral processes and may be involved in critical phases of neurodevelopmental and neurodegenerative disorders (17, 21, 29, 36, 100).

SCFAs and Microglia

The development of the nervous system is marked by the sculpting of the neuronal networks shaping the functional neural circuitry that is critical for normal cognitive, emotional, and social domains. In this context, glial cells, especially microglial cells, have been increasingly recognized to play a critical role in the elimination of excess or unnecessary synaptic connections, which is necessary for the maturation and refinement of circuits and connections in the nervous system (101, 102). Therefore, control of innate immune function in the CNS is critical for brain development, and the gut microbiota seems to play a pivotal role in the development and functionality of the immune system in the CNS. The results reported by Erny and collaborators shed light on how the microbiota might influence microglial maturation and function (6). While microglia from specific pathogen-free (SPF) mice shows normal maturation and function, non-colonized young GF mice exhibit stunted microglia under homeostatic conditions. It is noteworthy that the oral application of a mixture of the three major SCFAs acetate, propionate, and butyrate was sufficient to drive maturation of microglia in GF mice (6). Although the mechanisms involved in the control of maturation and function of microglia by SCFAs remain to be determined, the activation of FFAR2 could be conceivable since FFAR2-deficient mice displayed microglia reminiscent of those found in GF mice (103).

Neuroinflammation is also an important process shaping brain function. Similar to observations in GF mice, perturbations of the gut microbiota by antibiotics systemically produce altered immune responses in experimental models, notably toward a pro-inflammatory profile (6). This is also true in the CNS, which becomes more prone to extreme inflammatory responses

when the microbiota is depleted by antibiotics early in life (104). It was shown that antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influence neuroinflammation with altered microglial morphology (105–107). On the other hand, several studies have reported that sodium butyrate is capable of decreasing microglial activation and pro-inflammatory cytokines secretion (108–110). Also, butyrate treatment *in vitro* and *in vivo* induces morphological and functional changes in the microglia toward a homeostatic profile and inhibits LPS-induced pro-inflammatory modifications (109) and depression-like behavior (110). Likewise, acetate treatment of microglia primary culture has been shown to reduce inflammatory signaling through reduced IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression and p38 MAPK, JNK, and NF- κ B phosphorylation (111). Similarly, acetate was also able to modulate inflammatory cytokines and signaling pathways in astrocyte primary culture (112). Although the precise signaling involved in the effects of SCFAs on microglia remain unveiled, inhibition of HDACs, which results in epigenetically regulated gene expression, has been considered the main effector mechanism triggered by SCFAs (113). In this way, histone acetylation seems to modulate glial cells in an anti-inflammatory and neuroprotective manner. Therefore, taking into account the role of microglia in shaping neuronal networks and the influence of the microbiota on this process, SCFAs might provide new methods to modulate the brain immunity disruption underlying neurodevelopmental and neurodegenerative disorders.

SCFAs and Neurons

Apart from providing the cells with energy and affecting microglia maturation, these microbial metabolites also seem to influence neuronal function. It was described that SCFAs may modulate the levels of neurotransmitters and neurotrophic factors. Acetate has previously been shown to alter the levels of the neurotransmitters glutamate, glutamine and GABA in the hypothalamus and increase anorexigenic neuropeptide expression (114). Propionate and butyrate exert an influence on the intracellular potassium level, which implies the involvement of SCFAs in the operation of cell signaling systems (115). In particular, these SCFAs regulate the expression levels of tryptophan 5-hydroxylase 1, the enzyme involved in synthesis of serotonin, and tyrosine hydroxylase, which is involved in a rate-limiting step in the biosynthesis of dopamine, noradrenaline and adrenaline; therefore, producing an effect on brain neurochemistry (21, 55, 56, 116, 117). Antibiotic depletion of the microbiota also results in hippocampal neurogenesis and memory impairments, which can be partially recovered by the reconstitution of specific SPF microbiota and completely recovered by probiotic treatment or exercise (118). This cognitive deficit might be associated with changes in the expression of cognition-relevant signaling molecules such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B, serotonin transporter and neuropeptide Y system (119).

Neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), and BDNF that regulate the growth, survival and differentiation of neurons and synapses in the CNS also play important parts in learning

and memory and in a range of brain disorders have been also shown to be modulated by SCFAs (120–123). BDNF expression, neurogenesis, and neural proliferation in rodents (124–126), as well as facilitation of long-term memory consolidation, were stimulated by sodium butyrate (127). Further, physiological levels of all three SCFAs were shown to increase the growth rate of human neural progenitor cells and induce more cells to undergo mitosis (128), affording some hints of how SCFAs could regulate early neural system development. Further, SCFAs show effects on several neural functions, such as enhancing sleep (10), suppressing the activity of orexigenic neurons that express neuropeptide Y in the hypothalamus (89), and modulating the signaling triggered by the ghrelin receptor (129), contributing to circadian rhythm and appetite control. The seeking for mechanism involved in the modulation of neuronal function by SCFAs has unveiled that some of these effects are likely mediated by the activation of GPR41/GPR43 receptors. Other SCFA effects, especially of propionate and butyrate, are mediated through their HDAC inhibitory activity (108, 116).

Because of the similarity of SCFAs with the ketone bodies aceto-acetate and β -hydroxybutyrate (BHB), studies have been conducted to elucidate their role during fasting. Accordingly, fasting has been shown to sharply influence the gene regulation and protein expression of several MCTs, which alters the uptake of SCFAs in the gut and their transport to the brain (130). The regulation of the transporter is likely related to the direction of energy supplies to tissues during fasting. Moreover, Mileta and colleagues found that butyrate enhances growth hormone (GH) secretion in pituitary cells via GPR41/43 activation and intracellular accumulation of Ca^{2+} (131). This leads to the hypothesis that butyrate acts as a secondary mediator of metabolic adaptations of GH during fasting, which mainly include increased lipolysis and protein retention.

In summary, SCFAs might directly influence the brain by reinforcing BBB integrity, modulating neurotransmission, influencing levels of neurotrophic factors and promoting memory consolidation. However, further studies are needed to understand the precise mechanisms involved in these neuroactive effects.

SCFAS AND BRAIN DISORDERS

The synthesis of new proteins is necessary for long-term changes in synaptic plasticity and learning (132–134). In this context, learning and long-term memory formation are improved by enhanced histone acetylation (135), which could be improved by HDAC inhibitors (HDACi). Given the HDAC inhibition property of SCFAs, several animal studies have focused mainly on the use of butyrate to elevate histone acetylation in the brain during a critical phase of memory formation. These studies have reported an enhancement of long-term potentiation (LTP) and contextual fear memory induced by HDAC inhibition (124, 127, 136, 137), pointing out enteric SCFAs as a promising learning and memory modulators. Therefore, the discovery that the microbiota can influence brain physiology has led to a plethora of experiments involving neurological disorders. The central hypothesis is supported by experimental and clinical evidence that the microbiota is altered in such

diseases, which aggravates the condition, and/or its modulation might prevent or improve the development and progression of CNS pathologies (17, 19, 29, 33–37). Interestingly, several studies have found that the gut microbiome composition and, consequently, metabolome are altered in many brain disorders (138–142). Despite the knowledge that microbiota-gut-brain communication can theoretically occur through multiple systems (including the autonomic nervous system, enteric nervous system, neuroendocrine system, and immune system), increased evidence supports a potential key role of SCFAs in gut-brain axis signaling, and alterations in this signaling might underpin CNS disturbances ranging from neurodevelopmental disorders to neurodegenerative diseases.

SCFAs and Autism Spectrum Disorder

Characterized by behavioral symptoms including communication deficits, repetitive behaviors, and sensitivity to environmental changes, ASD comprises an array of neurodevelopmental disorders (143). Imbalances in the microbial composition of the gut are present in ASD. Support for this notion originates from animal studies and clinical evidence. However, the role of SCFAs in ASD is still controversial. Recently, Sharon and collaborators showed that microbiota transplantation from human ASD donors into mice could transfer ASD-relevant behavioral deficits (27). Although Sharon and coworkers did not evaluate the alteration in SCFAs, children with ASD have been previously reported to have both lower (144) and higher (33) fecal SCFA levels than controls. Interestingly, Wang and coworkers found similar proportions of specific SCFA and protein fermentation metabolites when comparing children with ASD with controls, even though the groups were controlled for gastrointestinal abnormalities, macronutrients intake and usage of probiotics, prebiotics, and antibiotics (33). However, neither of the previous studies performed a comprehensive evaluation of microbiota ecology.

In line with these findings, the microbiota has been suggested to affect the occurrence and severity of the disease through an increase in propionate-producing bacteria and a decrease in butyrate-producing bacteria (145, 146). The study conducted by Finegold and coworkers also found several pathobionts increased in the stool of ASD affected children such as *Proteobacteria* and hydrogen sulfide producing *Desulfovibrio*, raising a question for the causality of microbial metabolites unbalance (145, 146). Further, propionate-induced autism has become a validated animal model to study the disease. Administering high amounts of propionate through subcutaneous, intragastric, intraperitoneal, or intracerebroventricular routes to rodents has been suggested to induce high levels of microglia activation, neurotoxic cytokine production, genetic expression alterations, abnormal hippocampal histology, and abnormal neurobehaviors, such as repetitive actions and impaired social interaction (147). On the other hand, butyrate appears to have a beneficial effect on social and repetitive behavior in the BTBR mouse model, a strain-based ASD-like model (148). Epigenetic changes led to enhanced transcription of inhibitory neurotransmitter pathways in the frontal cortex, especially through HDAC inhibition (148). As described above, improvement of BBB impermeability by butyrate may be another mechanism through which butyrate

can revert abnormalities in propionic acid-induced autism-like disorder (143). This evidence points to the importance of balance of a microbiota but also highlights the difficulty in drawing conclusions on the role of SCFAs in ASD and the need for more research in patients with ASD.

SCFAs and Mood Disorders

Despite the complex pathophysiology of mood disorders, several studies have indicated the participation of the gut microbiota in the severity of these diseases. Major depression is one of the most common mood disorders, seriously impairing the quality of life of patients and is one of the leading causes of social disability. Untreated depression is associated with an increased risk of morbidity and mortality, including suicide. Monoamine deficiency (149) and neurogenesis disruption (150) are two predominant theories underpinning depression. Furthermore, it has been shown that inflammation biomarkers are increased among patients with depression, and pro-inflammatory cytokines play an important role in the physiopathology of the disease (150). The importance of the microbiota in depression is supported by findings that the levels of SCFAs are decreased in a naturally occurring non-human primate model of depression (26). In line with these findings, clinical evidence has shown that fecal SCFA concentrations are lower in patients with depression than in controls (35, 151). Moreover, current knowledge shows that butyrate possesses an antidepressant-like effect that reverses behavioral alterations in mouse models, such as low energy (126, 152), anhedonia (153), and cognitive and sociability impairments (154). Therefore, taking into account the anti-inflammatory property of SCFAs, dysbiosis followed by decreased levels of these metabolites could play a role in the inflammation process related to the development of depression.

Studies on chronic psychosocial stress have also shown a possible application for prebiotics (154) and SCFAs (8) in reverting sociability impairment while also reducing stress-induced corticosterone release. Sodium butyrate has been shown to be capable of reversing behavioral hyperactivity (155) and depressive-like and manic-like behaviors in rats (156). There is also evidence for butyrate's antimanic effect on a rat model of bipolar disorder induced by intracerebroventricular administration of ouabain (157). Contrarily, a microbiome study in schizophrenic patients at risk of developing psychosis reported enriched *Clostridiales*, *Prevotella*, and *Lactobacillus ruminis* and predicted increased SCFA production (141). However, the study did not perform direct measurement of the metabolites and further research to confirm whether it is a case of SCFA overproduction or a specific metabolite imbalance is needed.

SCFAs and Alzheimer's Disease

Accumulating evidence has demonstrated that key neuropathological processes underlying AD might also be modulated by SCFAs (25, 34, 158, 159). Characterized by progressive cognitive impairment, AD is the most common form of dementia (160). Given that AD has a complex pathology and that therapies that effectively halt the disease progression are still lacking, recent studies have focused on environmental

components and diet-based possible prevention strategies by using transgenic animal models (161, 162). In this context, several studies have established the benefits of a healthy microbiome on slowing AD and the correlation of dysbiosis with disease progression (7, 138, 163). Consistent with this notion, a study by Zhang and coworkers showed that the microbiota composition and diversity were perturbed and the level of SCFAs was reduced in AD mice, predicting alterations in more than 30 metabolic pathways, which may be associated with amyloid deposition and ultrastructural abnormalities in the APP/PS1 mouse model (25).

It is worth noting that SCFAs interfere with protein-protein interactions between amyloid- β peptides (A β), thereby disrupting their assembly into neurotoxic oligomers (34), the main toxins responsible for synapse dysfunction and cognitive deficits in AD (164). Given the close relation between gut dysbiosis and brain dysfunction, fecal microbiota transplantation (FMT) has been considered a promising therapeutic approach for the reestablishment of a healthy gut microbial community and has been shown to have beneficial effects on a plethora of diseases, including AD. Supporting this hypothesis, APP/PS1 mice exhibited significantly relieved cognitive deficits, A β accumulation, synaptic dysfunction, and neuroinflammation, mainly by the microglia, after FMT from healthy wild-type mice (165). These protective effects may be related to reversal of changes in the gut microbiota and SCFAs.

Oral bacteriotherapy through probiotic administration has become a potential treatment option for neurodegenerative diseases such as AD. Accordingly, the 3xTg mouse model of AD treated with probiotics in the early stage showed a promising reduction of inflammatory cytokines and decreased cognitive decline associated with reduced brain damage and A β aggregate accumulation (166). Moreover, other studies have shown beneficial effects of butyrate and probiotic treatment on cognition and memory in a D-galactose model of aging, a condition known to correlate with AD occurrence and progression (137, 167). The model consists of a long term administration of D-galactose, which can readily be metabolized but eventually leads to an overproduction of reactive oxygen species, thus causing genetic and cell damage impairing cognition (137, 168). Finally, through HDAC inhibition, butyrate administration recovered memory function and increased expression of genes implicated in associative learning in the APP/PS1 mouse model of AD (158).

SCFAs and Parkinson's Disease

SCFAs play a controversial role in Parkinson's disease (PD), a synucleinopathy and a multifactorial disorder with strong environmental influence characterized by tremors, muscle rigidity, bradykinesia, and impaired gait (169). Aggregation of the protein α -synuclein (α Syn) is thought to be the main pathogenic event in PD, which primarily affects dopaminergic neurons (169). Most PD patients also present gastrointestinal manifestations due to disturbances of the enteric nervous system. Hence, there has been great interest in the relationship between the gut microbiota and the development of the disease. Accordingly, sequencing of the microbiota of fecal samples from PD patients revealed reduced populations of *Bacteroidetes*

and *Prevotellaceae* in contrast to increased *Enterobacteriaceae* and reduced production of SCFAs when compared to matched controls (139). However, the presence of gut microbes is necessary to elicit pathophysiological alterations in a mouse model of α Syn overexpression, because elimination of the gut microbiota with antibiotics ameliorated the condition (169). In contrast, FMT from PD patient donors worsens disease progression suggesting the presence of specific disease-promoting microbes (169). Accordingly, Li and colleagues confirmed that PD patients suffer alterations in the microbiota that correlate with disease progression, as there is a continuous decrease in fiber-degrading bacterial strains and an increase in pathobionts (170). This conversion probably leads to a decrease in SCFA production and an increase in endotoxin and neurotoxin production (170). Supporting this hypothesis, growing evidence has shown that FMT from healthy donors (171) as well as butyrate administration in animal models of PD improves motor impairment and dopamine deficiency (172–175).

SCFAs and Sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative T-cell-mediated autoimmune disease of the CNS that mainly affects the myelin sheath around motor neurons. Among its etiological factors, the imbalance between pro and anti-inflammatory cells in the immune system seems to play an important role, which is highly affected by the gut microbiota composition and can be aggravated by dysbiosis (104, 176, 177). Given that SCFAs, mainly butyrate, are capable of inducing Treg polarization, modulation of the gut microbiota toward increased production of these metabolites could be an interesting therapeutic approach to MS. In fact, it is noteworthy that oral administration of SCFAs ameliorated the disease severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS (87, 178). Specifically, acetate supplementation is able to induce increased acetyl-CoA metabolism, which increases histone acetylation, resulting in preserved spinal cord lipid content and essentially preventing the onset of clinical symptoms of EAE (179). Furthermore, treatment with butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination through oligodendrocyte maturation and differentiation (180).

Efforts to modify the course of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) a disease that affects motor neurons but also involves a stronger genetic basis that leads to the premature death of those cells, has focused on the gut microbiota composition and its circulating metabolites (181). A comparative study conducted in human patients showed an elevated relative abundance of pathobionts compared to bacterial strains related to beneficial metabolism function (142). Another study found that transgenic ALS model mice had worse disease progression when raised under antibiotic treatment or GF conditions and identified several bacterial strains correlated with ameliorated or aggravated disease progression. A small assessment of the human microbiome/metabolite configuration was also conducted for comparison (181).

SCFAs and Metabolic Disorders

Much speculation currently surrounds the possible involvement of the gut microbiota in metabolic disorders such as type 2

diabetes and obesity. Compelling evidence have shown that the composition of the gut microbiota is altered in animal models of obesity and subjects with prediabetes or type 2 diabetes compared with controls (182–186). Despite differences in the identification of specific microbiome features responsible for these effects, a shift in the microbiome composition away from species able to produce butyrate was one consistent finding in type 2 diabetes subjects (187). Further, epidemiological and experimental studies have demonstrated that increased intake of dietary fiber reduces the risk for developing metabolic diseases (188–190), possibly by changing gut microbiome composition and diversity with increased production of SCFAs (187–189).

Animal studies suggest that SCFAs have an important role in the prevention and treatment of obesity-associated insulin resistance (89, 114, 191, 192). Mechanisms involved in the effects of SCFAs, mainly propionate and butyrate, in the brain responsible for controlling metabolic disorders include the activation of FFAR2 and FFAR3 receptors (91). It was shown that activation of these receptors leads to suppression of the activity of orexigenic neurons that express neuropeptide Y in the hypothalamus (89), and the modulation of the signaling mediated by the ghrelin receptor (129), contributing to circadian rhythm and appetite control. Studies in rodents show that the administration of prebiotics that influences a shift in the gut microbiome toward increased production of butyrate has beneficial effects associated with higher levels of GLP-1 (193–195), as well as hypothalamic expression of pro-opiomelanocortin (196), thereby influencing the hunger-satiety cycle. Although limited, some of these results were confirmed in human *in vivo* studies, as showed that acute rectal infusions of sodium acetate and SCFA mixtures increased circulating concentrations of PYY in individuals who were overweight (197–199).

CONCLUDING REMARKS

The gut microbiota has attracted considerable attention in recent years, putting it in the spotlight of biomedical research. Recent studies have suggested that an intestinal bacteria imbalance plays a role in the development of several disorders. The bidirectional communication that occurs between the microbiota and its mammalian host can be mediated through a variety of mechanisms, and it is clear that the biochemical messengers produced by the microbiota are an important facet of this crosstalk. Convincing evidence exists that SCFAs produced by the intestinal microbiota are involved in gastrointestinal physiology, immune function, host metabolism, and even in development and homeostasis of the CNS.

Although our understanding of microbiota-host interactions has considerably increased over recent years, there is still an unmet requirement for a deeper understanding of the complex microbiota-gut-brain communication. Furthermore, since most studies have been conducted in rodents, one must be cautious when translating the effects of SCFAs on humans. Given that SCFAs can regulate CNS processes through direct and indirect means and ultimately shape behavior and cognitive function, a thorough comprehension of how these

metabolites participate in these complex gut-brain interactions may aid in developing novel therapeutic targets for treating CNS disorders. Further, through their effects on the development and maintenance of healthy brain function, these metabolites hold the potential for use as dietary interventions with a range of psychological functions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YS, AB, and RF planned, researched, and wrote the manuscript.

FUNDING

Work in the authors' laboratories has been supported by grants from Brazilian National Council for Development of Science and Technology (CNPq/Brazil), State of Rio de Janeiro Foundation for Funding Research (FAPERJ-JCNE-E-26/203.195/2016), Inova Fiocruz Program (Inova Fiocruz/VPPCB), National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), and the Mercosur Program for Structural Convergence (FOCEM).

REFERENCES

- Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. (2012) 336:1268–73. doi: 10.1126/science.1223490
- Erny D, Hrabec de Angelis AL, Prinz M. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. *Immunology*. (2017) 150:7–15. doi: 10.1111/imm.12645
- Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med*. (2016) 375:2369–79. doi: 10.1056/NEJMra1600266
- Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. (2012) 13:260–70. doi: 10.1038/nrg3182
- Palm NW, Zoete MR De, Flavell RA, Haven N. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin Immunol*. (2016) 159:122–7. doi: 10.1016/j.clim.2015.05.014
- Erny D, De Angelis ALH, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. (2015) 18:965–77. doi: 10.1038/nn.4030
- Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. (2012) 13:701–12. doi: 10.1038/nrn3346
- van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, Wiley N, Strain C, O'Sullivan O, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Physiol*. (2018) 596:4923–44. doi: 10.1113/JP276431
- Borre YE, O'Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med*. (2014) 20:509–18. doi: 10.1016/j.molmed.2014.05.002
- Szentirmai E, Millican NS, Massie AR, Kapás L. Butyrate, a metabolite of intestinal bacteria, enhances sleep. *Sci Rep*. (2019) 9:7035. doi: 10.1038/s41598-019-43502-1
- Wang X, Sun G, Feng T, Zhang J, Huang X, Wang T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res*. (2019) 29:787–803. doi: 10.1038/s41422-019-0216-x
- Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol*. (2014) 817:115–33. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_5
- Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. (2004) 558:263–75. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388
- Mudd AT, Berding K, Wang M, Donovan SM, Dilger RN. Serum cortisol mediates the relationship between fecal Ruminococcus and brain N-acetylaspartate in the young pig. *Gut Microbes*. (2017) 8:589–600. doi: 10.1080/19490976.2017.1353849
- O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res*. (2015) 277:32–48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027
- Sherwin E, Dinan TG, Cryan JF. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Ann NY Acad Sci*. (2018) 1420:5–25. doi: 10.1111/nyas.13416
- Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*. (2017) 20:145–55. doi: 10.1038/nn.4476
- Calvani R, Picca A, Lo Monaco MR, Landi F, Bernabei R, Marzetti E. Of microbes and minds: a narrative review on the second brain aging. *Front Med*. (2018) 5:53. doi: 10.3389/fmed.2018.00053
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. In: *Advances in Immunology*. Alt FW, editor. Cambridge, MA: Academic Press Inc. (2014). p. 91–119.
- Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: the bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochem Int*. (2016) 99:110–32. doi: 10.1016/j.neuint.2016.06.011
- Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. (2019) 16:461–78. doi: 10.1038/s41575-019-0157-3
- Pascale A, Marchesi N, Marelli C, Coppola A, Luzzi L, Govoni S, et al. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*. (2018) 61:357–71. doi: 10.1007/s12020-018-1605-5
- Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, Van Der Veeken J, Deroos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. (2013) 504:451–5. doi: 10.1038/nature12726
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic treg cell homeostasis. *Science*. (2013) 341:569–74. doi: 10.1126/science.1241165
- Zhang L, Wang Y, Xiayu X, Shi C, Chen W, Song N, et al. Altered gut microbiota in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. (2017) 60:1241–57. doi: 10.3233/JAD-170020
- Deng FL, Pan JX, Zheng P, Xia JJ, Yin BM, Liang WW, et al. Metabonomics reveals peripheral and central shortchain fatty acid and amino acid dysfunction in a naturally occurring depressive model of macaques. *Neuropsychiatr Dis Treat*. (2019) 15:1077–88. doi: 10.2147/NDT.S186071
- Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, et al. Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice. *Cell*. (2019) 177:1600–18.e17. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.004
- Dinan TG, Cryan JF. Microbes, immunity, and behavior: psychoneuroimmunology meets the microbiome. *Neuropsychopharmacology*. (2017) 42:178–92. doi: 10.1038/npp.2016.103
- Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The central nervous system and the gut microbiome. *Cell*. (2016) 167:915–32. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.027
- Kim HL, Chang BJ, Nam SM, Nahm SS, Lee JH. Increased osteopontin expression and mitochondrial swelling in 3-nitropropionic acid-injured rat brains. *Rom J Morphol Embryol*. (2017) 58:1249–56.
- Andersson U, Tracey KJ. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol*. (2012) 30:313–35. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075015

32. Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ, Ju G. Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World J Gastroenterol.* (2002) 8:540–5. doi: 10.3748/wjg.v8.i3.540
33. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Dig Dis Sci.* (2012) 57:2096–102. doi: 10.1007/s10620-012-2167-7
34. Ho L, Ono K, Tsuji M, Mazzola P, Singh R, Pasinetti GM. Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in Alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms. *Expert Rev Neurother.* (2018) 18:83–90. doi: 10.1080/14737175.2018.1400909
35. Skonieczna-zydecka K, Grochans E, Maciejewska D, Szkup M, Schneider-Matyka D, Jurczak A, et al. Faecal short chain fatty acids profile is changed in Polish depressive women. *Nutrients.* (2018) 10:E1939. doi: 10.3390/nu10121939
36. Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. Cross talk: the microbiota and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci.* (2017) 11:490. doi: 10.3389/fnins.2017.00490
37. Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am.* (2017) 46:77–89. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.007
38. Ben-Ari Y. Neuropaediatric and neuroarchaeology: understanding development to correct brain disorders. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* (2013) 102:331–4. doi: 10.1111/apa.12161
39. Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol Psychiatry.* (2012) 17:1228–38. doi: 10.1038/mp.2012.23
40. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry.* (2013) 18:666–73. doi: 10.1038/mp.2012.77
41. Russell SL, Gold MJ, Willing BP, Thorson L, McNagny KM, Finlay BB. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. *Gut Microbes.* (2013) 4:158–64. doi: 10.4161/gmic.23567
42. Tochitani S, Ikeno T, Ito T, Sakurai A, Yamauchi T, Matsuzaki H. Administration of non-absorbable antibiotics to pregnant mice to perturb the maternal gut microbiota is associated with alterations in offspring behavior. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0138293. doi: 10.1371/journal.pone.0138293
43. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell.* (2016) 165:1762–75. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.001
44. Foley KA, Ossenkopp K-P, Kavaliers M, MacFabe DF. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. *PLoS ONE.* (2014) 9:e87072. doi: 10.1371/journal.pone.0087072
45. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science.* (2016) 353:772–7. doi: 10.1126/science.aag3194
46. Jašarević E, Rodgers AB, Bale TL. A novel role for maternal stress and microbial transmission in early life programming and neurodevelopment. *Neurobiol Stress.* (2015) 1:81–8. doi: 10.1016/j.ynstr.2014.10.005
47. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107:11971–5. doi: 10.1073/pnas.1002601107
48. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe.* (2015) 17:690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004
49. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108:4578–85. doi: 10.1073/pnas.1000081107
50. Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* (2003) 4:103–12. doi: 10.1038/nrn1032
51. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol.* (2007) 7:161–7. doi: 10.1038/nri2015
52. Amor S, Peferoen LAN, Vogel DYS, Breur M, van der Valk P, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology.* (2014) 142:151–66. doi: 10.1111/imm.12233
53. Wendeln AC, Degenhardt K, Kaurani L, Gertig M, Ulas T, Jain G, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature.* (2018) 556:332–8. doi: 10.1038/s41586-018-0023-4
54. Abdel-Haq R, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *J Exp Med.* (2019) 216:41–59. doi: 10.1084/jem.20180794
55. Reigstad CS, Salomonson CE, Rainey JF, Szurszewski JH, Linden DR, Sonnenburg JL, et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J.* (2015) 29:1395–403. doi: 10.1096/fj.14-259598
56. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell.* (2015) 161:264–76. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.047
57. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2009) 6:306–14. doi: 10.1038/nrgastro.2009.35
58. Goehler LE, Gaykema RPA, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun.* (2005) 19:334–44. doi: 10.1016/j.bbi.2004.09.002
59. Browning KN, Verheijden S, Boeckxstaens GE. The vagus nerve in appetite regulation, mood, and intestinal inflammation. *Gastroenterology.* (2017) 152:730–44. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.046
60. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil.* (2011) 23:1132–9. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x
61. Miller TL, Wolin MJ. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl Environ Microbiol.* (1996) 62:1589–92. doi: 10.1128/AEM.62.5.1589-1592.1996
62. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett.* (2009) 294:1–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x
63. Fernandes J, Su W, Rahat-Rozenbloom S, Wolever TMS, Comelli EM. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. *Nutr Diabetes.* (2014) 4:e121. doi: 10.1038/nutd.2014.23
64. Luu M, Pautz S, Kohl V, Singh R, Romero R, Lucas S, et al. The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nat Commun.* (2019) 10:760. doi: 10.1038/s41467-019-08711-2
65. Cummings JH, Pomare EW, Branch HWJ, Naylor CPE, MacFarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* (1987) 28:1221–7. doi: 10.1136/gut.28.10.1221
66. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* (1990) 70:567–90. doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.567
67. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* (2003) 62:67–72. doi: 10.1079/PNS2002207
68. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* (2017) 19:29–41. doi: 10.1111/1462-2920.13589
69. Smith EA, Macfarlane GT. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe.* (1997) 3:327–37. doi: 10.1006/anae.1997.0121
70. Smith E, Macfarlane G. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. *FEMS Microbiol Ecol.* (1998) 25:355–68. doi: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00487.x
71. Windey K, de Preter V, Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res.* (2012) 56:184–96. doi: 10.1002/mnfr.201100542

72. Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl Environ Microbiol.* (2002) 68:5186–90. doi: 10.1128/AEM.68.10.5186-5190.2002
73. Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr.* (2004) 91:915–23. doi: 10.1079/BJN20041150
74. Bugaut M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B.* (1987) 86:439–72. doi: 10.1016/0305-0491(87)90433-0
75. Vijay N, Morris ME. Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Curr Pharm Des.* (2014) 20:1487–98. doi: 10.2174/13816128113199990462
76. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res.* (2016) 57:943–54. doi: 10.1194/jlr.R067629
77. Primec M, Mičetić-Turk D, Langerholc T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: a scoping review. *Anal Biochem.* (2017) 526:9–21. doi: 10.1016/j.ab.2017.03.007
78. Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis.* (2010) 16:1138–48. doi: 10.1002/ibd.21177
79. Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* (2009) 139:1619–25. doi: 10.3945/jn.109.104638
80. Gaudier E, Rival M, Buisine M-P, Robineau I, Hoebler C, Hoebler C. Butyrate enemas upregulate muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol Res.* (2009) 58:111–9.
81. O'Keefe SJD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2016) 13:691–706. doi: 10.1038/nrgastro.2016.165
82. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr.* (2018) 57:1–14. doi: 10.1007/s00394-018-1703-4
83. Bolognini D, Tobin AB, Milligan G, Moss CE. The pharmacology and function of receptors for short-chain fatty acids. *Mol Pharmacol.* (2016) 89:388–98. doi: 10.1124/mol.115.102301
84. Cherbut C, Ferrier L, Rozé C, Anini Y, Blottière H, Lecannu G, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am J Physiol.* (1998) 275:G1415–22. doi: 10.1152/ajpgi.1998.275.6.G1415
85. Puddu A, Sanguineti R, Montecucco F, Viviani GL. Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes. *Mediators Inflamm.* (2014) 2014:162021. doi: 10.1155/2014/162021
86. Kien CL, Peltier CP, Mandal S, Davie JR, Blauwiel R. Effects of the *in vivo* supply of butyrate on histone acetylation of cecum in piglets. *J Parenter Enter Nutr.* (2008) 32:51–6. doi: 10.1177/014860710803200151
87. Haghikia A, Jorg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, et al. Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity.* (2015) 43:817–29. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.007
88. Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol.* (2013) 14:660–7. doi: 10.1038/ni.2611
89. Li Z, Yi CX, Katiraei S, Kooijman S, Zhou E, Chung CK, et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut.* (2018) 67:1269–79. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314050
90. Mollica MP, Raso GM, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, Aceto S, et al. Butyrate regulates liver mitochondrial function, efficiency, and dynamics in insulin-resistant obese mice. *Diabetes.* 66:1405–18. doi: 10.2337/db16-0924
91. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell.* (2014) 156:84–96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016
92. Kekuda R, Manoharan P, Baseler W, Sundaram U. Monocarboxylate 4 mediated butyrate transport in a rat intestinal epithelial cell line. *Dig Dis Sci.* (2013) 58:660–7. doi: 10.1007/s10620-012-2407-x
93. Oldendorf WH. Carrier mediated blood brain barrier transport of short chain monocarboxylic organic acids. *Am J Physiol.* (1973) 224:1450–3. doi: 10.1152/ajplegacy.1973.224.6.1450
94. Human Metabolome Database. Available online at: <http://www.hmdb.ca/> (accessed December 27, 2019).
95. Bachmann C, Colombo JP, Berüter J. Short chain fatty acids in plasma and brain: quantitative determination by gas chromatography. *Clin Chim Acta.* (1979) 92:153–9. doi: 10.1016/0009-8981(79)90109-8
96. Liu J, Sun J, Wang F, Yu X, Ling Z, Li H, et al. Neuroprotective effects of *Clostridium butyricum* against vascular dementia in mice via metabolic butyrate. *Biomed Res Int.* (2015) 2015:1–12. doi: 10.1155/2015/412946
97. Sun J, Ling Z, Wang F, Chen W, Li H, Jin J, et al. *Clostridium butyricum* pretreatment attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice via anti-oxidation and anti-apoptosis. *Neurosci Lett.* (2016) 613:30–5. doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.047
98. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* (2015) 6:263ra158. doi: 10.1126/scitranslmed.3009759
99. Hoyles L, Snelling T, Umlai U-K, Nicholson JK, Carding SR, Glen RC, et al. Microbiome-host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood-brain barrier. *Microbiome.* (2018) 6:55. doi: 10.1186/s40168-018-0439-y
100. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol.* (2017) 595:489–503. doi: 10.1113/JP273106
101. Hong S, Beja-Glasser VE, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science.* (2016) 352:712–6. doi: 10.1126/science.aad8373
102. Wilton DK, Dissing-Olesen L, Stevens B. Neuron-glia signaling in synapse elimination. *Annu Rev Neurosci.* (2019) 42:107–27. doi: 10.1146/annurev-neuro-070918-050306
103. Gautiar EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubczik C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* (2012) 13:1118–28. doi: 10.1038/ni.2419
104. Stanisavljević S, Cepić A, Bojić S, Veljović K, Mihajlović S, Đedović N, et al. Oral neonatal antibiotic treatment perturbs gut microbiota and aggravates central nervous system autoimmunity in Dark Agouti rats. *Sci Rep.* (2019) 9:1–13. doi: 10.1038/s41598-018-37505-7
105. Minter MR, Zhang C, Leone V, Ringus DL, Zhang X, Oyler-Castrillo P, et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* (2016) 6:30028. doi: 10.1038/srep30028
106. Minter MR, Hinterleitner R, Meisel M, Zhang C, Leone V, Zhang X, et al. Antibiotic-induced perturbations in microbial diversity during post-natal development alters amyloid pathology in an aged APP SWE /PS1 ΔE9 murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* (2017) 7:10411. doi: 10.1038/s41598-017-11047-w
107. Jang H-M, Lee H-J, Jang S-E, Han MJ, Kim D-H. Evidence for interplay among antibacterial-induced gut microbiota disturbance, neuro-inflammation, and anxiety in mice. *Mucosal Immunol.* (2018) 11:1386–97. doi: 10.1038/s41385-018-0042-3
108. Patnala R, Arumugam TV, Gupta N, Dheen ST. HDAC inhibitor sodium butyrate-mediated epigenetic regulation enhances neuroprotective function of microglia during ischemic stroke. *Mol Neurobiol.* (2017) 54:6391–411. doi: 10.1007/s12035-016-0149-z
109. Wang P, Zhang Y, Gong Y, Yang R, Chen Z, Hu W, et al. Sodium butyrate triggers a functional elongation of microglial process via Akt-small RhoGTPase activation and HDACs inhibition. *Neurobiol Dis.* (2018) 111:12–25. doi: 10.1016/j.nbd.2017.12.006
110. Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, et al. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res.* (2018) 1680:13–38. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004

111. Soliman ML, Puig KL, Combs CK, Rosenberger TA. Acetate reduces microglia inflammatory signaling *in vitro*. *J Neurochem.* (2012) 123:555–67. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07955.x
112. Soliman ML, Combs CK, Rosenberger TA. Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol.* (2013) 8:287–300. doi: 10.1007/s11481-012-9426-4
113. Reddy DS, Wu X, Golub VM, Dashwood WM, Dashwood RH. Measuring histone deacetylase inhibition in the brain. *Curr Protoc Pharmacol.* (2018) 81:e41. doi: 10.1002/cpph.41
114. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun.* (2014) 5:3611. doi: 10.1038/ncomms4611
115. Oleskin AV, Shenderov BA. Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microb Ecol Heal Dis.* (2016) 27:30971. doi: 10.3402/mehd.v27.30971
116. Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF, La Gamma EF. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells - possible relevance to autism spectrum disorders. *PLoS ONE.* (2014) 9:e103740. doi: 10.1371/journal.pone.0103740
117. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Mini-review: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol.* (2014) 28:1221–38. doi: 10.1210/me.2014-1108
118. Möhle L, Mattei D, Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Alutis M, et al. Ly6Chi monocytes provide a link between antibiotic-induced changes in gut microbiota and adult hippocampal neurogenesis. *Cell Rep.* (2016) 15:1945–56. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.074
119. Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun.* (2016) 56:140–55. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.020
120. Savignac HM, Corona G, Mills H, Chen L, Spencer JPE, Tzortzis G, et al. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. *Neurochem Int.* (2013) 63:756–64. doi: 10.1016/j.neuint.2013.10.006
121. Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Amboni RT, et al. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res.* (2015) 61:114–21. doi: 10.1016/j.jpsyres.2014.11.003
122. Intlekofer KA, Berchtold NC, Malvaez M, Carlos AJ, McQuown SC, Cunningham MJ, et al. Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology.* (2013) 38:2027–34. doi: 10.1038/npp.2013.104
123. Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Faller CJ, Ceretta RA, Petronilho F, et al. Sodium butyrate prevents memory impairment by re-establishing BDNF and GDNF expression in experimental pneumococcal meningitis. *Mol Neurobiol.* (2015) 52:734–40. doi: 10.1007/s12035-014-8914-3
124. Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J Neurochem.* (2009) 110:1226–40. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06212.x
125. Yoo DY, Kim W, Nam SM, Kim DW, Chung JY, Choi SY, et al. Synergistic effects of sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on increase of neurogenesis induced by pyridoxine and increase of neural proliferation in the mouse dentate gyrus. *Neurochem Res.* (2011) 36:1850–7. doi: 10.1007/s11064-011-0503-5
126. Wei Y Bin, Melas PA, Wegener G, Mathe AA, Lavebratt C. Antidepressant-like effect of sodium butyrate is associated with an increase in tet1 and in 5-hydroxymethylation levels in the BDNF gene. *Int J Neuropsychopharmacol.* (2015) 18:1–10. doi: 10.1093/ijnp/pyu032
127. Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem.* (2004) 279:40545–59. doi: 10.1074/jbc.M402229200
128. Yang LL, Millischer V, Rodin S, MacFabe DF, Villaescusa JC, Lavebratt C. Enteric short-chain fatty acids promote proliferation of human neural progenitor cells. *J Neurochem.* (2019) e14928. doi: 10.1111/jnc.14928. [Epub ahead of print].
129. Torres-Fuentes C, Golubeva AV, Zhdanov AV, Wallace S, Arboleya S, Papkovsky DB, et al. Short-chain fatty acids and microbiota metabolites attenuate ghrelin receptor signaling. *FASEB J.* (2019) 33:13546–59. doi: 10.1096/fj.201901433R
130. Schutkowski A, Wege N, Stangl GI, König B. Tissue-specific expression of monocarboxylate transporters during fasting in mice. *PLoS ONE.* (2014) 9:e112118. doi: 10.1371/journal.pone.0112118
131. Miletta MC, Petkovic V, Eblé A, Ammann RA, Flück CE, Mullis PE. Butyrate increases intracellular calcium levels and enhances growth hormone release from rat anterior pituitary cells via the G-protein-coupled receptors GPR41 and 43. *PLoS ONE.* (2014) 9:e107388. doi: 10.1371/journal.pone.0107388
132. Dale N, Kandel ER, Schacher S. Serotonin produces long-term changes in the excitability of aplysia sensory neurons in culture that depend on new protein synthesis. *J Neurosci.* (1987) 7:2232–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-07-02232.1987
133. Montarolo PG, Golet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science.* (1986) 234:1249–54. doi: 10.1126/science.3775383
134. Buffington SA, Huang W, Costa-Mattioli M. Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Ann Rev Neurosci.* (2014) 37:17–38. doi: 10.1146/annurev-neuro-071013-014100
135. Gräff J, Tsai LH. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci.* (2013) 14:97–111. doi: 10.1038/nrn3427
136. Zhong T, Qing QJ, Yang Y, Zou WY, Ye Z, Yan JQ, et al. Repression of contextual fear memory induced by isoflurane is accompanied by reduction in histone acetylation and rescued by sodium butyrate. *Br J Anaesth.* (2014) 113:634–43. doi: 10.1093/bja/aeu184
137. Garcez ML, de Carvalho CA, Mina F, Belletini-Santos T, Schiavo GL, da Silva S, et al. Sodium butyrate improves memory and modulates the activity of histone deacetylases in aged rats after the administration of D-galactose. *Exp Gerontol.* (2018) 113:209–17. doi: 10.1016/j.exger.2018.10.005
138. Hill JM, Bhattacharjee S, Pogue AI, Lukiw WJ. The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. *Front Neurol.* (2014) 5:43. doi: 10.3389/fneur.2014.00043
139. Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Park Relat Disord.* (2016) 32:66–72. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.08.019
140. Li H, Sun J, Wang F, Ding G, Chen W, Fang R, et al. Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain Res.* (2016) 1642:70–8. doi: 10.1016/j.brainres.2016.03.031
141. He Y, Kosciolk T, Tang J, Zhou Y, Li Z, Ma X, et al. Gut microbiome and magnetic resonance spectroscopy study of subjects at ultra-high risk for psychosis may support the membrane hypothesis. *Eur Psychiatry.* (2018) 53:37–45. doi: 10.1016/j.eurpsy.2018.05.011
142. Zhai C-D, Zheng J-J, An B-C, Huang H-F, Tan Z-C. Intestinal microbiota composition in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Chin Med J.* (2019) 132:1815–22. doi: 10.1097/CM9.0000000000000351
143. Downs R, Perna J, Vitelli A, Cook D, Dhurjati P. Model-based hypothesis of gut microbe populations and gut/brain barrier permeabilities in the development of regressive autism. *Med Hypotheses.* (2014) 83:649–55. doi: 10.1016/j.mehy.2014.09.005
144. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism - comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* (2011) 11:22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22
145. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe.* (2010) 16:444–53. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.06.008
146. Finegold SM. *Desulfovibrio* species are potentially important in regressive autism. *Med Hypotheses.* (2011) 77:270–4. doi: 10.1016/j.mehy.2011.04.032

147. Choi J, Lee S, Won J, Jin Y, Hong Y, Hur T-Y, et al. Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0192925. doi: 10.1371/journal.pone.0192925
148. Kratsman N, Getselter D, Elliott E. Sodium butyrate attenuates social behavior deficits and modifies the transcription of inhibitory/excitatory genes in the frontal cortex of an autism model. *Neuropharmacology*. (2016) 102:136–45. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.11.003
149. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry*. (2000) 61:7–11.
150. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:22–34. doi: 10.1038/nri.2015.5
151. Szczesniak O, Hestad KA, Hanssen JF, Rudi K. Isovaleric acid in stool correlates with human depression. *Nutr Neurosci*. (2016) 19:279–83. doi: 10.1179/1476830515Y.0000000007
152. Valvassori S, Resende W, Budni J, Dal-Pont G, Bavarese D, Reus G, et al. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, reverses behavioral and mitochondrial alterations in animal models of depression induced by early- or late-life stress. *Curr Neurovasc Res*. (2015) 12:312–20. doi: 10.2174/1567202612666150728121121
153. Sun J, Wang F, Hong G, Pang M, Xu H, Li H, et al. Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neurosci Lett*. (2016) 618:159–66. doi: 10.1016/j.neulet.2016.03.003
154. Burokas A, Arbolea S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, et al. Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biol Psychiatry*. (2017) 82:472–87. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.12.031
155. Moretti M, Valvassori SS, Varela RB, Ferreira CL, Rochi N, Benedet J, et al. Behavioral and neurochemical effects of sodium butyrate in an animal model of mania. *Behav Pharmacol*. (2011) 22:766–72. doi: 10.1097/FBP.0b013e32834d0f1b
156. Resende WR, Valvassori SS, Réus GZ, Varela RB, Arent CO, Ribeiro KE, et al. Effects of sodium butyrate in animal models of mania and depression: implications as a new mood stabilizer. *Behav Pharmacol*. (2013) 24:569–79. doi: 10.1097/FBP.0b013e32834d0f1b
157. Valvassori SS, Dal-Pont GC, Steckert AV, Varela RB, Lopes-Borges J, Mariot E, et al. Sodium butyrate has an antimanic effect and protects the brain against oxidative stress in an animal model of mania induced by ouabain. *Psychiatry Res*. (2016) 235:154–9. doi: 10.1016/j.psychres.2015.11.017
158. Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, Sananbenesi F, Fischer A. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J Alzheimer's Dis*. (2011) 26:187–97. doi: 10.3233/JAD-2011-110080
159. Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging Cell*. (2015) 14:957–70. doi: 10.1111/acel.12387
160. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. *World Alzheimer Report 2016: Improving Healthcare for People Living With Dementia: Coverage, Quality and Costs Now and in the Future*. (2016). Available online at: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016> (accessed December 28, 2019).
161. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet*. (2004) 13:159–70. doi: 10.1093/hmg/ddh019
162. Frozza RL, Lourenco MV, de Felice FG. Challenges for Alzheimer's disease therapy: insights from novel mechanisms beyond memory defects. *Front Neurosci*. (2018) 12:37. doi: 10.3389/fnins.2018.00037
163. Hoffiman JD, Yanckello LM, Chlipala G, Hammond TC, McCulloch SD, Parikh I, et al. Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. *PLoS ONE*. (2019) 14:e0221828. doi: 10.1371/journal.pone.0221828
164. Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, De Felice FG. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*. (2015) 9:191. doi: 10.3389/fncel.2015.00191
165. Sun J, Xu J, Ling Y, Wang F, Gong T, Yang C, et al. Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Transl Psychiatry*. (2019) 9:189. doi: 10.1038/s41398-019-0525-3
166. Bonfili L, Cecarini V, Berardi S, Scarpona S, Suchodolski JS, Nasuti C, et al. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Sci Rep*. (2017) 7:1–21. doi: 10.1038/s41598-017-02587-2
167. Ho ST, Hsieh YT, Wang SY, Chen MJ. Improving effect of a probiotic mixture on memory and learning abilities in D-galactose-treated aging mice. *J Dairy Sci*. (2019) 102:1901–9. doi: 10.3168/jds.2018-15811
168. Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells. *Life Sci*. (2011) 88:82–8. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.021
169. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*. (2016) 167:1469–80.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.018
170. Li W, Wu X, Hu X, Wang T, Liang S, Duan Y, et al. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Sci China Life Sci*. (2017) 60:1223–33. doi: 10.1007/s11427-016-9001-4
171. Sun MF, Zhu YL, Zhou ZL, Jia XB, Da Xu Y, Yang Q, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain Behav Immun*. (2018) 70:48–60. doi: 10.1016/j.bbi.2018.02.005
172. Liu J, Wang F, Liu S, Du J, Hu X, Xiong J, et al. Sodium butyrate exerts protective effect against Parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon like peptide-1. *J Neurol Sci*. (2017) 381:176–81. doi: 10.1016/j.jns.2017.08.3235
173. Paiva I, Pinho R, Pavlou MA, Hennon M, Wales P, Schütz AL, et al. Sodium butyrate rescues dopaminergic cells from alpha-synuclein-induced transcriptional deregulation and DNA damage. *Hum Mol Genet*. (2017) 26:2231–46. doi: 10.1093/hmg/ddx114
174. St. Laurent R, O'Brien LM, Ahmad ST. Sodium butyrate improves locomotor impairment and early mortality in a rotenone-induced *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. (2013) 246:382–90. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.037
175. Sharma S, Taliyan R, Singh S. Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities: modulation of histone deacetylase activity. *Behav Brain Res*. (2015) 291:306–14. doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.052
176. Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, Von Glehn E, Yan R, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun*. (2016) 7:12015. doi: 10.1038/ncomms12015
177. Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Soldan MMP, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep*. (2016) 6:28484. doi: 10.1038/srep28484
178. Mizuno M, Noto D, Kaga N, Chiba A, Miyake S. The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0173032. doi: 10.1371/journal.pone.0173032
179. Chevalier AC, Rosenberger TA. Increasing acetyl-CoA metabolism attenuates injury and alters spinal cord lipid content in mice subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*. (2017) 141:721–37. doi: 10.1111/jnc.14032
180. Chen T, Noto D, Hoshino Y, Mizuno M, Miyake S. Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. *J Neuroinflammation*. (2019) 16:165. doi: 10.1186/s12974-019-1552-y
181. Blacher E, Bashiardes S, Shapiro H, Rothschild D, Mor U, Dori-Bachash M, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*. (2019) 572:474–80. doi: 10.1038/s41586-019-1443-5
182. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. (2009) 457:480–4. doi: 10.1038/nature07540
183. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type

- 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*. (2010) 5:e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085
184. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. (2013) 498:99–103. doi: 10.1038/nature12198
185. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, et al. Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metab*. (2017) 26:611–9.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.008
186. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS ONE*. (2013) 8:e71108. doi: 10.1371/journal.pone.0071108
187. Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vösa U, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. (2019) 51:600–5. doi: 10.1038/s41588-019-0350-x
188. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism*. (2012) 61:1058–66. doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.017
189. Keenan MJ, Zhou J, Hegsted M, Pelkman C, Durham HA, Coulon DB, et al. Role of resistant starch in improving gut health, adiposity, and insulin resistance. *Adv Nutr*. (2015) 6:198–205. doi: 10.3945/an.114.007419
190. Edwards CA, Xie C, Garcia AL. Dietary fibre and health in children and adolescents. *Proc Nutr Soc*. 74:292–302. doi: 10.1017/S0029665115002335
191. Den Besten G, Bleeker A, Gerding A, Van Eunen K, Havinga R, Van Dijk TH, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a pparγ-dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*. (2015) 64:2398–408. doi: 10.2337/db14-1213
192. Lu Y, Fan C, Li P, Lu Y, Chang X, Qi K. Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating g protein-coupled receptors and gut microbiota. *Sci Rep*. (2016) 6:37589. doi: 10.1038/srep37589
193. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. (2012) 61:364–71. doi: 10.2337/db11-1019
194. Yadav H, Lee JH, Lloyd J, Walter P, Rane SG. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem*. (2013) 288:25088–97. doi: 10.1074/jbc.M113.452516
195. Barrea L, Muscogiuri G, Annunziata G, Laudisio D, Pugliese G, Salzano C, et al. From gut microbiota dysfunction to obesity: could short-chain fatty acids stop this dangerous course? *Hormones*. (2019) 18:245–50. doi: 10.1007/s42000-019-00100-0
196. Ahmadi S, Naggal R, Wang S, Gagliano J, Kitzman DW, Soleimani-Zad S, et al. Prebiotics from acorn and sago prevent high-fat-diet-induced insulin resistance via microbiome-gut-brain axis modulation. *J Nutr Biochem*. (2019) 67:1–13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.011
197. van der Beek CM, Canfora EE, Lenaerts K, Troost FJ, Damink SWMO, Holst JJ, et al. Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men. *Clin Sci*. (2016) 130:2073–82. doi: 10.1042/CS20160263
198. Freeland KR, Wolever TMS. Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-α. *Br J Nutr*. (2010) 103:460–6. doi: 10.1017/S0007114509991863
199. Canfora EE, Van Der Beek CM, Jocken JWE, Goossens GH, Holst JJ, Olde Damink SWM, et al. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial. *Sci Rep*. (2017) 7:2360. doi: 10.1038/s41598-017-02546-x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Silva, Bernardi and Frozza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.