

GABRIELA DE CÁSSIA ÁVILA ALPINO

**EFEITO DO KEFIR DE LEITE NA HISTOMORFOMETRIA INTESTINAL E AÇÃO
CEREBRAL EM CAMUNDONGOS KNOCKOUT IL-10**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Maria do Carmo Gouveia
Peluzio

Coorientadores: Mariana de Moura e Dias
Tiago Antônio de O. Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A457e
2023
Alpino, Gabriela de Cássia Ávila, 1995-
Efeito do kefir de leite na histomorfometria intestinal e ação cerebral em camundongos *Knockout* IL-10 / Gabriela de Cássia Ávila Alpino. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (115 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.046>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Kefir. 2. Eixo encéfalo-intestino. 3. Ácidos graxos. 4. Interleucina-10. 5. Neuroproteção. I. Pelúzio, Maria do Carmo Gouveia, 1958-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 637.146


GABRIELA DE CÁSSIA ÁVILA ALPINO

**EFEITO DO KEFIR DE LEITE NA HISTOMORFOMETRIA INTESTINAL E AÇÃO
CEREBRAL EM CAMUNDONGOS KNOCKOUT IL-10**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de janeiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 GABRIELA DE CASSIA AVILA ALPINO
Data: 24/02/2023 14:54:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Gabriela de Cássia Ávila Alpino
Autora

Documento assinado digitalmente
 MARIA DO CARMO GOUVEIA PELUZIO
Data: 24/02/2023 17:18:43-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho e renovar minha fé.

A toda minha família pelo apoio. Sobretudo minha mãe Ivanir Ávila, meu pai Carlo Frederico, meu irmão Lucas Alpino e minha cunhada Luana Moraes pelo amor, confiança, escuta e apoio.

Ao Matheus Imbelloni, meu companheiro, pela parceria, amor, apoio, confiança e muita paciência. Você trouxe leveza quando mais precisei!

À minha orientadora professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela oportunidade de crescimento acadêmico, ensinamentos, e confiança.

À minha coorientadora e amiga professora Mariana de Moura e Dias pela acolhida, ensinamentos, disposição, parcerias, conselhos, boas energias e pela confiança. Seguimos!

Ao meu coorientador professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes pelos ensinamentos, ideias, conselhos, acessibilidade e confiança.

À professora Aline Silva de Aguiar e à professora Manoela Maciel dos Santos Dias pela sugestões, contribuições, carinho e disponibilidade.

À toda equipe do LABIN Pietra, Katya, Iasmim, Mariana, Andressa, Vinicius, Manoela e Toninho pela ajuda, trocas de conhecimento e amizade.

À Ananda Aguiar, pós doutoranda do laboratório de biotecnologia molecular, pelos ensinamentos, auxílio técnico, paciência e parceria.

Aos meus amigos, especialmente, Aline, Victória e Helena pela escuta, conselhos, apoio e torcida.

À Soryana Melo, minha companheira de estadia em Viçosa, pelo suporte, conselhos, força e amizade durante esse período.

A todos os brilhantes professores que fizeram parte da minha formação e são uma inspiração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho.

RESUMO

ALPINO, Gabriela de Cássia Ávila, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2023. **Efeito do kefir de leite na histomorfometria intestinal e ação cerebral em camundongos *knockout* IL-10.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Mariana de Moura e Dias e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A inflamação intestinal contribui para o desequilíbrio da microbiota intestinal, o que prejudica a produção de metabólitos úteis para o cérebro como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O kefir é uma bebida probiótica, que se destaca por modular a microbiota intestinal e favorecer metabólitos neuroativos que melhoram a saúde cerebral. Contudo, os efeitos neuroprotetores do kefir e os mecanismos dos seus metabólitos sobre as funções cerebrais são pouco explorados, especialmente em modelo de inflamação intestinal (*knockout* IL-10). Neste estudo, investigou-se o consumo do kefir sobre a neuroproteção em camundongos *knockout* IL-10 e revisou-se os mecanismos do ácido butírico, sobre as funções cerebrais. Fez-se ensaio *in vivo* com camundongos C57BL-6 machos, divididos em quatro grupos com 5 animais em cada: grupo selvagem e água (WWT), que recebeu dieta comercial e água filtrada, grupo selvagem e kefir (KWT) que recebeu dieta comercial e kefir de leite, grupo *knockout* IL-10 e água (WKO), que consumiu dieta comercial e água filtrada, grupo *knockout* IL-10 e kefir (KKO), que consumiu dieta comercial e kefir de leite. Todos os animais receberam 0,1 ml/dia de kefir ou de água administrados por gavagem. Após a eutanásia, foram coletados os cérebros e intestinos delgados. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados para análise de citocinas, atividade antioxidante e, ácidos graxos de cadeia curta, enquanto os intestinos delgados foram utilizados para análises histológicas. O grupo KKO apresentou maior altura, área das vilosidades, e profundidade de criptas no intestino delgado comparado ao WKO. O consumo de kefir exibiu ações neuroprotetoras diretas por aumentar AGCC e reduzir malondialdeído no cérebro do grupo KKO. Entretanto, o consumo de kefir não reduziu o aumento das citocinas inflamatórias no cérebro dos animais *knockout* IL-10. Investigou-se pela primeira vez os efeitos do consumo de kefir de leite no cérebro de camundongos induzidos a inflamação intestinal utilizando modelo *knockout* IL-10 e verificou-se sua capacidade neuroprotetora indireta por melhorar a histologia intestinal e direta por favorecer os AGCC no cérebro. Além disso, os resultados reforçam o papel central da

IL-10 para a homeostase imunológica, incluindo a homeostase cerebral, o que permite concluir que os efeitos neuroprotetores encontrados pelo consumo de kefir na infamação intestinal provavelmente serão pronunciados na presença de IL-10. Observou-se também, por meio de dados da literatura, que os mecanismos moleculares do butirato sobre as funções cerebrais envolvem pelo menos a combinação da sinalização do receptor acoplado à proteína G (GPCR) e epigenética.

Palavras-chave: Kefir. Intestino-microbiota-cérebro. Ácidos graxos de cadeia curta. IL-10. Neuroproteção.

ABSTRACT

ALPINO, Gabriela de Cássia Ávila, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2023. **Effect of milk kefir on intestinal histomorphometry and brain action in IL-10 knockout mice.** Advisor: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Mariana de Moura e Dias and Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Intestinal inflammation contributes to the imbalance of the intestinal microbiota, which impairs the production of useful metabolites for the brain, such as short-chain fatty acids (SCFA). Kefir is a probiotic drink, which stands out for modulating the intestinal microbiota and favoring neuroactive metabolites that improve brain health. However, the neuroprotective effects of kefir and the mechanisms of its metabolites on brain functions are little explored, especially in a model of intestinal inflammation (IL-10 knockout). In this study, kefir consumption was investigated on neuroprotection in IL-10 knockout mice and the mechanisms of butyric acid on brain functions were reviewed. An in vivo study was carried out with male C57BL-6 mice, divided into four groups with 5 animals each: wild type and water group (WWT), which received commercial diet and filtered water, wild type and kefir group (KWT) which received commercial diet and milk kefir, IL-10 knockout and water group (WKO), which consumed commercial diet and filtered water, IL-10 knockout and kefir group (KKO), which consumed commercial diet and milk kefir. All animals received 0.1 ml/day of kefir or water administered by gavage. After euthanasia, brains and small intestines were collected. Brain tissues were homogenized for analysis of cytokines, antioxidant activity, and short-chain fatty acids, while small intestines were used for histological analyses. The KKO group had greater height, villus area, and crypt depth in the small intestine compared to the WKO group. Kefir consumption exhibited direct neuroprotective actions by increasing SCFA and reducing malondialdehyde in the brain of the KKO group. However, kefir consumption did not reduce the increase in inflammatory cytokines in the brain of IL-10 knockout mice. The effects of milk kefir consumption on the brain of mice induced intestinal inflammation were investigated for the first time using an IL-10 knockout model, and its neuroprotective capacity was verified indirectly by improving intestinal histology and directly by favoring SCFA in the brain. Furthermore, the results reinforce the central role of IL-10 for immune homeostasis, including cerebral homeostasis, which allows to conclude that the

neuroprotective effects found by kefir consumption on intestinal inflammation are probably to be pronounced in the presence of IL-10. It was also observed, through literature data, that the molecular mechanisms of butyrate on brain functions involve at least the combination of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling and epigenetics.

Keywords: Kefir. Gut-microbiota-brain. Short-chain fatty acids. IL-10. Neuroprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Eixo intestino-microbiota-cérebro	15
Figura 2 – Potenciais vias de interação dos AGCC com o cérebro.....	22
Figura 3 – Grãos de kefir e bebida fermentada.....	26
Figura 4 – Fluxograma do preparo de kefir de leite.....	35
Figura 5 – Delineamento experimental.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta.
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor.</i>
BBB	<i>Blood Brain Barrier.</i>
BHE	Barreira hematoencefálica.
EM	Esclerose Múltipla.
EPS	Expolissacarídeos.
EROS	Espécies reativas de oxigênio.
GABA	Ácido gama-aminobutírico.
GDNF	<i>Glial cell-line-derived neurotrophic factor.</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide.</i>
GPCR	Receptor acoplado à proteína G.
HDACi	<i>Histone deacetylase inhibitor.</i>
HPA	Hipotálamo-pitutária-adrenal.
IgA	Imunoglobulina A.
IFN- γ	Interferon gama.
IL	Interleucina.
LPS	Lipopolissacarídeo.
MCTs	Transportadores de monocarboxilato.
MGB	<i>Microbiota-gut-brain.</i>
NaB	Butirato de sódio.
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa B.
PA	Ácido propiônico.
PYY	<i>Peptide YY.</i>
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina).
SMCTs	Transportadores de sódio-monocarboxilato.
SNC	Sistema Nervoso Central.
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance.</i>
TGI	Trato Gastrointestinal.
TNF- α	Fator de necrose tumoral α .
Treg	Células T regulatórias.
ZO-1	Zonulina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Eixo intestino-microbiota-cérebro	14
3.2 Ácidos graxos de cadeia curta na saúde cerebral	21
3.3 Kefir	25
3.4 Kefir: um psicobiótico	29
3.5 Interleucina 10 e inflamação intestinal	30
4. OBJETIVOS	32
4.1 Geral	32
4.2 Específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Aspectos éticos	33
5.2 Material de trabalho	33
5.3 Preparo do Kefir	33
5.4 Desenho experimental	36
5.5 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	37
5.6 Determinação da expressão gênica de proteínas de junção epitelial	37
5.6.1 Extração do RNA	37
5.6.2 Tratamento do RNA com Dnase	38
5.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)	38
5.6.4 PCR em tempo real (qPCR)	39
5.7 Análise de citocinas	40
5.8 Análise das enzimas envolvidas no processo oxidativo	40

5.8.1 Catalase (CAT)	40
5.8.2 Superóxido Dismutase (SOD).....	41
5.8.3 Glutathiona S Transferase (GST)	41
5.9 Mensuração da peroxidação lipídica.....	41
5.10 Análises histológicas do intestino delgado	42
5.11 Análises estatísticas.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. RESULTADOS	57
7.1 Artigo 1 (Revisão)	578
7.2 Artigo 2 (Original).....	85
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	111
9. ANEXO.....	112
9.1 Coautoria em trabalhos.....	112
9.2 Aprovação do Comitê de Ética.....	113
9.3 Cálculo amostral	114

1. INTRODUÇÃO

O eixo intestino-microbiota-cérebro é um sistema complexo de comunicação entre o trato gastrointestinal (TGI), os microorganismos que o habitam, os sistemas nervosos periférico e o sistema nervoso central (SNC) (MÖRKL et al., 2020).

Por meio de vias neuro-humorais complexas, os sinais do cérebro podem alterar funções sensório-motoras e secretoras do intestino e inversamente, os sinais aferentes viscerais originados no TGI podem modular funções cerebrais (DALILE et al., 2019).

A microbiota intestinal compreende a comunidade ecológica de microorganismos simbióticos, benéficos e patogênicos presentes no intestino que participam do desenvolvimento e manutenção de órgãos e processos fisiológicos, incluindo desde a maturação do sistema imune neuronal ao desenvolvimento cognitivo e comportamento do hospedeiro (CHEN et al., 2021; PEREIRA et al., 2021; ZENGELER & LUKENS, 2021).

O desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, com o favorecimento dos microorganismos patogênicos em relação aos benéficos e simbióticos, prejudica a resposta imune da mucosa intestinal, aumenta a permeabilidade intestinal, as citocinas inflamatórias e a translocação de antígenos. Além disso, esse desequilíbrio, presentes nas doenças inflamatórias intestinais, reduz os metabólitos úteis para a saúde cerebral como os neurotransmissores e os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), o que contribui para a neuroinflamação e/ou progressão da neuroinflamação instaurada (DE PALMA et al., 2014; DALILE et al., 2019; KOWALSKI & MULAK, 2019).

Camundongos deficientes em interleucina 10 (IL-10) desenvolvem inflamação espontânea no intestino (enterocolite) devido aos déficits na regulação imunológica, favorecendo a colonização de microorganismos maléficos sobre os microorganismos benéficos, que acomete com maior gravidade o cólon e em menor grau o intestino delgado (ZURITA-TURK et al., 2020).

Além da sua importante ação anti-inflamatória de resposta imune na mucosa intestinal, a IL-10 inibe a ocorrência de inflamação sistêmica devido à sua atividade

imunossupressora etem papel central na regulação negativa das cascatas inflamatórias (ASADULLAH et al., 2003).

Neste contexto, destaca-se o kefir, uma bebida probiótica fermentada capaz de modular a microbiota intestinal e estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, a resposta imunomoduladora, além dos AGCC que melhoram a integridade da barreira intestinal e a produção de muco (PELUZIO et al., 2021). Em conjunto, essas ações previnem a translocação de antígenos para o lúmen intestinal e conseqüentemente, inibem a inflamação sistêmica e a neuroinflamação através do aperfeiçoamento de defesa intestinal.

Dentre os AGCC, o ácido butírico se destaca por sua ampla gama de funções que influenciam o cérebro: aumento da expressão de proteínas de junção epitelial e muco no intestino, regulação da resposta imune, produção e a liberação periférica de hormônios glucagon-like peptide (GLP-1) and peptide YY (PYY) (CANTU-JUNGLES, RASMUSSEN, AND HAMAKER 2019), reforçando a defesa intesinal e prevenindo indiretamente alterações cerebrais.

Em adição, o butirato é capaz de influenciar diretamente o SNC ao atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e regular sua integridade, o que está fortemente associado com o controle da passagem de moléculas e nutrientes da circulação para o cérebro, desempenhando um papel importante na homeostase cerebral (BRANISTE et al., 2014; SILVA, BERNARDI, AND FROZZA 2020).

Além do kefir estimular a produção de AGCC através da sua microbiota probiótica, essa bebida também é fonte de AGCC e outros componentes bioativos como os expopolissacarídeos (EPS), polipeptídeos, ácido lático e outros metabólitos com função antimicrobiana (CHEN et al., 2022). Desse modo, o kefir aumenta a circulação sanguínea de componentes bioativos, como os AGCC, que podem alcançar o cérebro.

Apesar dos conhecidos efeitos probióticos do kefir, sua facilidade de preparo e baixo custo (PELUZIO et al., 2021), não há estudos que avaliam os efeitos neuroprotetores do consumo de kefir em modelos de risco para disfunções cerebrais como é o caso do *knockout* IL-10 que desenvolve inflamação intestinal. Entretanto, tem-se evidências que o consumo de kefir melhora sintomas neurodegenerativos e/ou

comportamentais em modelos de doenças cerebrais instauradas (VAN DE WOUW et al., 2021; CHEN et al., 2021).

Logo, torna-se relevante avaliar os efeitos neuroprotetores do kefir em modelo *knockout* IL-10, considerado um modelo de risco para disfunções cerebrais, e os mecanismos moleculares de seus metabólitos envolvidos nas ações cerebrais. Além de investigar os mecanismos da IL-10 nas funções cerebrais.

2. JUSTIFICATIVA

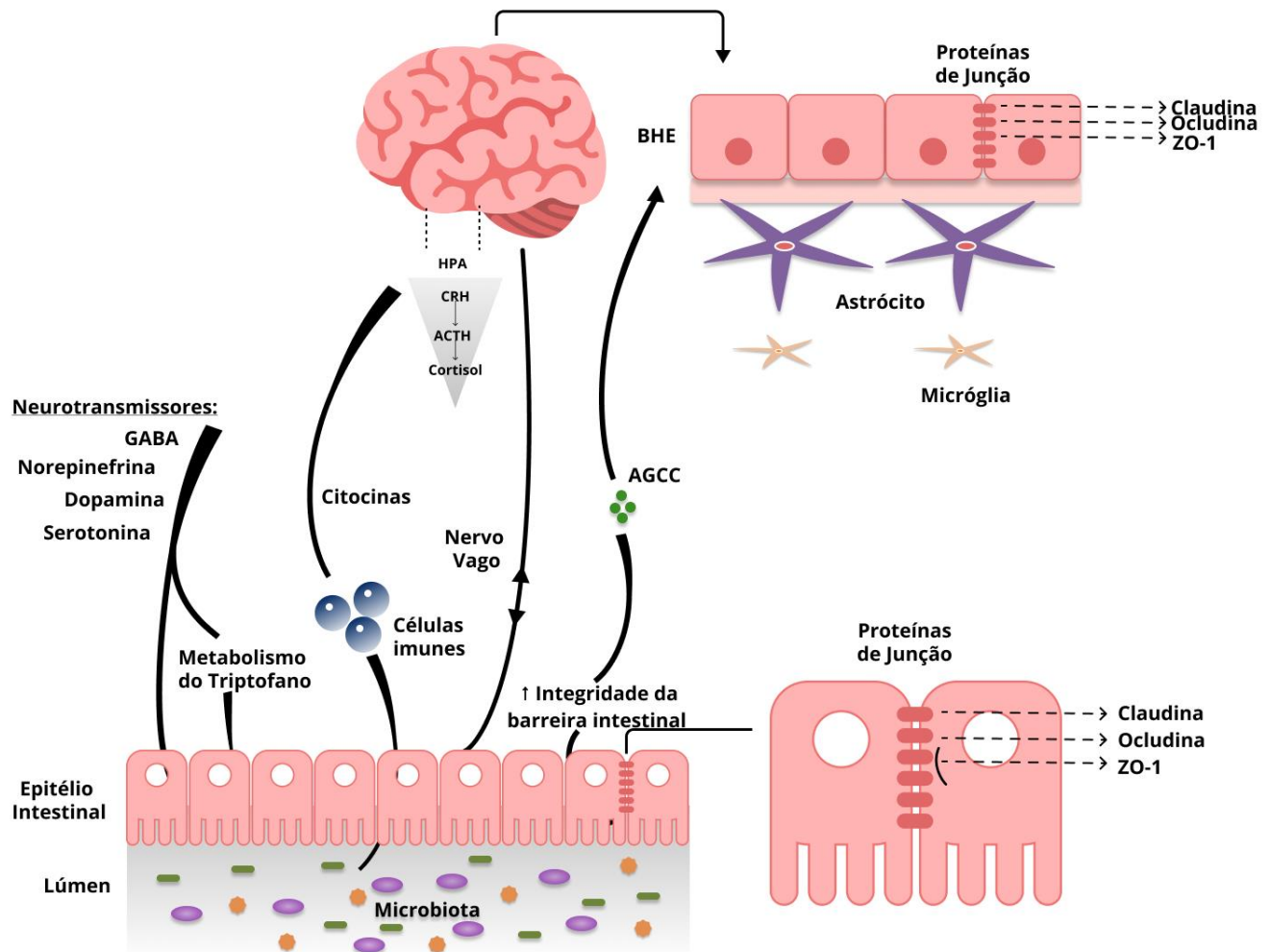
Esse trabalho possibilitou avaliar, pela primeira vez, os efeitos neuroprotetores do consumo de kefir de leite em camundongos de risco para o desenvolvimento de disfunções cerebrais (*knockout* IL-10), permitindo esclarecer a lacuna do conhecimento acerca dos possíveis efeitos preventivos do consumo de kefir de leite no cérebro de camundongos *knockout* IL-10. Da mesma forma, determinar o impacto da ausência da IL-10 nos possíveis efeitos ativados pelo consumo de kefir no cérebro, e definir os mecanismos moleculares do kefir, e do ácido butírico, nas funções cerebrais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Eixo intestino-microbiota-cérebro

O eixo intestino-microbiota-cérebro constitui um sistema bidirecional de comunicação entre o TGI e o SNC. Este eixo compõe o SNC, sistema nervoso entérico, sistema nervoso autônomo (nervo vago), neuroendócrino e neuroimune, bem como a microbiota intestinal (GRENHAM et al. 2011). Os mecanismos envolvidos na transmissão de sinal nesse eixo são complexos e ainda não totalmente elucidados, mas incluem as vias nervo vago, neuroendócrinas, imunes e metabólicas (Figura 1).

Figura 1 – Eixo intestino-microbiota-cérebro (Autor, 2023)



A microbiota pode produzir compostos neuroativos, como os neurotransmissores: GABA (ácido gama-aminobutírico), noradrenalina, dopamina e serotonina, aminoácidos (triptofano) e metabólitos microbianos (ácidos graxos de cadeia curta). Esses metabólitos podem interagir com o sistema imunológico do hospedeiro, influenciar o metabolismo e/ou afetar funções neuronais através das vias aferentes do nervo vago, células do sistema nervoso entérico e por vias humorais. A microbiota intestinal também pode influenciar a integridade da barreira intestinal e da barreira hematoencefálica por estimular a produção de proteínas de junção (zonulina, ocludina e claudina). Dentro do sistema nervoso, o estresse e a produção de citocinas podem ativar o eixo Hipotálamo- pitútaria-adrenal (HPA), estimulando a secreção de hormônios como o hormônio do receptor de corticotropina (CRH), desencadeando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que então inicia a síntese e liberação de cortisol. O cortisol, por sua vez, regula as respostas de sinalização neuroimune e inflamatórias, o que afeta a integridade da barreira intestinal, mediadores imunológicos e neurotransmissores, levando a alterações no ambiente intestinal e na composição da microbiota.

O nervo vago é uma via chave de comunicação entre o cérebro e a microbiota intestinal (Figura 1). Bravo et al. (2011) demonstraram que os animais vagotomizados

perderam os efeitos cerebrais induzidos pelo *Lactobacillus rhamnosus*. Da mesma forma, Li et al. (2018) demonstraram que animais vagotomizados tiveram a saciedade induzida por metabólitos microbianos anulada.

A microbiota intestinal também regula a produção de neurotransmissores como a serotonina via regulação de triptofano (Figura 1). *Bifidobacterium infantis* demonstrou elevar os níveis plasmáticos de triptofano e, assim, influenciar a transmissão central de serotonina (5HT) (DESBONNET et al., 2010). Além da via do triptofano, a microbiota intestinal regula a produção de serotonina via produção de AGCC e pela metabolização de ácidos biliares produzidos no fígado (VAN DE WOUW et al., 2017; GAO et al., 2019).

Apesar de mais de 90% da serotonina ser produzida a nível intestinal, ela não é capaz de atravessar a BHE e agir diretamente no SNC. O impacto da serotonina intestinal nas funções cerebrais é mais indireto com a transmissão de sinais para neurônios extrínsecos e intrínsecos presentes no intestino (sistema nervoso entérico), promoção do peristaltismo intestinal, motilidade, secreção, vasodilatação e absorção de nutrientes, favorecendo o ambiente intestinal e conseqüentemente o eixo microbiota-intestino-cérebro (O'MAHONY et al., 2015; AGUS et al., 2018). Ainda, o metabolismo microbiano do triptofano afeta a disponibilidade do triptofano periférico, que é capaz de atravessar a BHE e interferir nos níveis de serotonina central via Triptofano Hidroxilase 2 (Tph2), gerando benefícios relacionados ao bem estar (GAO et al., 2019).

Além da serotonina, a síntese e liberação de outros neurotransmissores de bactérias foi relatado: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium spp* podem produzir ácido g-aminobutírico (GABA); *Escherichia*, *Bacillus* e *Saccharomyces spp* podem produzir noradrenalina; *Candida*, *Streptococcus*, *Escherichia* e *Enterococcus spp* podem produzir serotonina; *Bacillus* podem produzir dopamina; e *Lactobacillus* podem produzir acetilcolina (DINAN & CRYAN et al., 2016) (Figura 1).

A microbiota intestinal é um fator crucial para o desenvolvimento e função do sistema imunológico periférico, incluindo sistema neuroimune através do desenvolvimento, maturação e ativação da micróglia, célula imune inata do cérebro (ABDEL-HAQ et al., 2019). Alterações na função da micróglia estão associadas ao estresse, distúrbios comportamentais e neurodegenerativos, o que sugere que a

microbiota intestinal pode influenciar doenças neurológicas através de efeitos mediados por micróglia (BOLLINGER et al., 2017; SAMPSON et al., 2016).

Da mesma forma, o estresse social também influencia a microbiota intestinal. Observa-se então, redução de *Bacteroides spp* e *Lactobacillus spp*, enquanto nota-se o aumento dos gêneros *Clostridium*, o que podem contribuir em alterações na função imune e déficits no neurodesenvolvimento (MOLINA-TORRES et al., 2019). Além disso, estudos mostram que eventos estressores no início da vida como separação maternal em ratos podem programar suscetibilidade ao estresse e distúrbios psiquiátricos da prole na idade adulta em resposta a hiperativação do eixo Hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (VAN BODEGOM et al., 2017).

Tal eixo é considerado o principal sistema neuroendócrino de regulação ao estresse que resulta na produção de cortisol e desempenha um papel relevante no eixo intestino-microbiota-cérebro (Figura 1). Condições patológicas que são influenciadas pelo estresse físico e/ou psicológico desregulam o eixo HPA, e conseqüentemente, o eixo intestino-microbiota-cérebro, por exemplo na inflamação intestinal (DINAN & CRYAN, 2016).

A microbiota intestinal e o cérebro também interagem através do sistema imune via circulação de citocinas (HSIAO et al., 2013) (Figura 1). As citocinas produzidas no intestino podem alcançar a circulação sanguínea e chegar até ao cérebro. Sob condições fisiológicas normais é improvável que atravessem a BHE, mas evidências crescentes sugerem que a desintegridade da BHE condiciona a sinalização das citocinas, capaz de influenciar áreas cerebrais como o hipocampo. Em adição, algumas citocinas como interleucina (IL) 1 e IL-6 ativam o eixo HPA, ocasionando a liberação de cortisol, reforçando a complexidade de interações microbiota intestinal-sistema imune-cérebro (DINAN & CRYAN, 2016).

Os AGCC são produtos metabólicos essenciais da microbiota intestinal e, dentre eles destacam-se o butirato, propionato e o acetato. Os AGCC exercem uma série de efeitos benéficos ao hospedeiro que incluem ações neuroprotetoras e imunorreguladoras (XIONG et al. 2022). A nível intestinal os AGCC aumentam a produção de proteínas de junção e de muco, e regulam a imunidade da mucosa intestinal,

por interagirem diretamente com células imunes no intestino via receptor acoplado a proteína G (GPCR) (DALILE et al., 2019) (Figura 1).

Todas essas ações em conjunto, reforçam a defesa intestinal e previnem a inflamação sistêmica indiretamente, por melhorar a integridade da barreira epitelial intestinal e evitar a translocação de bactérias e/ou produtos bacterianos, que podem, por sua vez, reduzir a neuroinflamação no cérebro.

A nível cerebral, os AGCC regulam a integridade da BHE, através da modulação da expressão das proteínas de junção no cérebro (Figura 1), o que está estreitamente relacionado com a passagem controlada de substâncias da circulação para o cérebro (BRANISTE et al., 2014; SILVA, BERNARDI, AND FROZZA 2020). Além disso, os AGCC são capazes de atravessar a BHE e agir diretamente na regulação neuroimune e anti-inflamatória no cérebro através de uma combinação de mecanismos que incluem ligação com os GPCRs e provavelmente como inibidor de histonas desacetilases (HDACi), um mecanismo epigenético (DALILE et al., 2019).

As proteínas de junção compreendem difentes famílias de proteínas transmembranares expressas nos tecidos endoteliais como claudina, ocludina, molécula de adesão juncional-A (JAM-A) e proteínas intercelulares como zonulinas e cingulina (SUZUKI, 2020). Claudinas 5 (cldn5), claudina 12 (cldn 12), zonulina-1 (zo-1) e zonulina-2 (zo-2) parecem ser expressas em todos os tecidos endoteliais, inclusive no intestino e cérebro (DANEMAN & PRAT, 2015).

No intestino, as proteínas de junção regulam a permeabilidade paracelular e fornecem uma barreira física contra as moléculas inflamatórias intestinais, reforçando a integridade da barreira epitelial intestinal. Essa bareira participa fortemente da imunidade inata intestinal e depende da interação de outros componentes como a camada de muco, imunoglobulina A (IgA) e peptídeos antimicrobianos (SUZUKI, 2020). A integridade prejudicada dessas permite translocação de antígenos como o lipopolissacarídeo (LPS), resultando em ativação forçada de células imunes e inflamação em diferentes tecidos, incluindo o cérebro, podendo levar à neuroinflamação (SUZUKI, 2020).

Da mesma forma, as proteínas de junção unem células epiteliais da BHE, criando polaridade epitelial e uma barreira paracelular de alta resistência que protege o SNC

contra o sistema imune periférico e moléculas do sangue (DANEMAN & PRAT, 2015). A integridade prejudicada dessas proteínas no cérebro facilita a passagem de moléculas indesejadas ao SNC, levando a ativação neuroimune e neuroinflamação de forma mais direta (DANEMAN & PRAT, 2015).

A neuroinflamação é um conjunto de respostas imunológicas do SNC, diferindo de várias maneiras da inflamação periférica, principalmente no que diz respeito às principais células envolvidas (micróglia e astrócitos) (LYMAN et al., 2014). A superativação e desregulação da micróglia gera alterações morfológicas e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6, e TNF- α , espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem levar à morte neuronal, perda da integridade da BHE e neuroinflamação crônica (BLOCK, ZECCA AND HONG, 2007).

Neuroinflamação é uma condição comum a patologia de várias doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer (LYMAN et al., 2014). Além das doenças neurodegenerativas, estudos em animais e em humanos tem demonstrado que os desafios imunológicos gerados pela neuroinflamação podem induzir comportamento depressivo e ansioso (RAISON, CAPURON AND MILLER, 2006).

A microbiota intestinal pode influenciar a neuroinflamação através da expressão das proteínas de junção. Por exemplo, animais germ-free apresentaram redução da expressão de ocludina e claudina-5 no hipocampo, córtex frontal e corpo estriado, caracterizando aumento da permeabilidade da BHE comparado com ratos de microbiota saudável (BRANISTE et al., 2014). A colonização com microrganismos livres de patógenos aumentou a expressão de ZO-1, ocludina e claudina 5, restabelecendo a integridade da BHE (BRANISTE et al., 2014).

Estudos em animais e humanos indicam que a microbiota intestinal também influencia a depressão, ansiedade, memória e outras funções cerebrais através de uma série de mecanismos que abrangem o eixo intestino-microbiota-cérebro (GRENHAM et al., 2011; KELLY et al., 2016; SUN et al., 2019; CAPUCO et al., 2020). Esses mecanismos incluem a produção de metabólitos e compostos neuroativos, ativação do sistema nervoso autônomo (sistema nervoso entérico e nervo vago), do eixo hipotálamo-hipófise-

adrenal, do sistema neuroendócrino e do sistema neuroimune explorados acima (MÖRKL et al., 2020; MORAIS, SCHREIBER AND MAZMANIAN, 2021).

A microbiota intestinal constitui uma coleção de microorganismos que residem de forma comensal e simbiótica no lúmen intestinal, e inclui bactérias, arqueas, fungos, vírus e outros microorganismos (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2019). O microbioma intestinal constitui 95% do microbioma humano, e a proporção de genes microbianos para genes hospedeiros é 150:1 (BHATTACHARJEE & LUKIW, 2013; TSE, 2017). Em adição, mais de 99% da microbiota intestinal é composta por bactérias anaeróbicas, com cerca de 100 trilhões de bactérias e mais de 1000 espécies descritas, o que representa 10 vezes mais o número de células somáticas do corpo humano (BHATTACHARJEE & LUKIW, 2013; TSE, 2017).

Destaca-se que a microbiota intestinal protege o hospedeiro contra microorganismos patogênicos e neutraliza os efeitos de toxinas e/ou outras drogas. Além disso, fornece metabólitos e vitaminas essenciais para o hospedeiro, o que gera uma fonte de energia adicional para os colonócitos e facilita a absorção de íons e moléculas (ZHENG et al., 2021). A microbiota também está relacionada aos processos tróficos (crescimento e diferenciação) de linhagens celulares epiteliais, o que é fundamental para o desenvolvimento e a maturação do sistema imunológico iniciado na vida fetal (ZENGLER & LUKENS, 2021).

A eubiose, estado de equilíbrio e diversidade entre os microorganismos que compõe a microbiota intestinal, fornece metabólitos benéficos ao hospedeiro, colaborando com a manutenção da homeostase imunológica, integridade da barreira epitelial intestinal, barreira hematoencefálica e desenvolvimento e manutenção neuroimune (IEBBA et al., 2016; FRÖHLICH et al., 2016).

Já a disbiose, estado de desequilíbrio gerado por grandes mudanças no ambiente microbiano intestinal, apresenta metabólitos não saudáveis e está associada a diversos desfechos imunológicos comprometedores (WEISS & HENNET, 2017). Dentre eles, destaca-se a patógenese das doenças inflamatórias intestinais e doenças cerebrais, incluindo a depressão (CAPUCO et al., 2020.)

A disbiose leva à liberação de proteínas amilóides, lipopolissacarídeos e outros marcadores pró-inflamatórios, que ativam vias de sinalização inflamatórias, aumentam a permeabilidade do intestino e da BHE, contribuindo para a neuroinflamação e o aparecimento de sintomas depressivos (TON et al., 2020a, CAPUCO et al., 2020).

O desequilíbrio entre as bactérias intestinais pode ser influenciado por várias causas como translocação ou crescimento de grupos bacterianos patogênicos, uso de antibióticos, idade, estresse, má alimentação, sedentarismo e comprometimento imunológico (IEBBA et al., 2016).

3.2 Ácidos graxos de cadeia curta na saúde cerebral

Os AGCC são ácidos graxos saturados de comprimento que variam de um a seis átomos de carbono e são produzidos principalmente a partir da fermentação colônica de fibras dietéticas e polissacarídeos complexos à base de plantas (PARKER; FONSECA & CARDING, 2020). Entre os AGCC, o acetato, propionato e butirato são encontrados em maior abundância no cólon, na razão molar de aproximadamente 60:25:15, respectivamente (GANAPATHY et al., 2013). Outros AGCC, como formato, valerato e caproato são produzidos em menor quantidade (MACFARLANE & MACFARLANE, 2003).

Mais de 95% dos AGCC são absorvidos pelos colonócitos principalmente via transportadores de monocarboxilato (MCTs) dependentes de H⁺ ou transportadores de monocarboxilato dependentes de sódio (SMCTs), expressos em abundância nas células endoteliais, gerando ATP e energia para essas células em indivíduos saudáveis (SCHÖNFELD & WOJTCZAK, 2016). Portanto, apenas uma pequena porção de AGCC atinge o sistema hepático através da veia porta e são metabolizados pelos hepatócitos (CHAMBERS 2019).

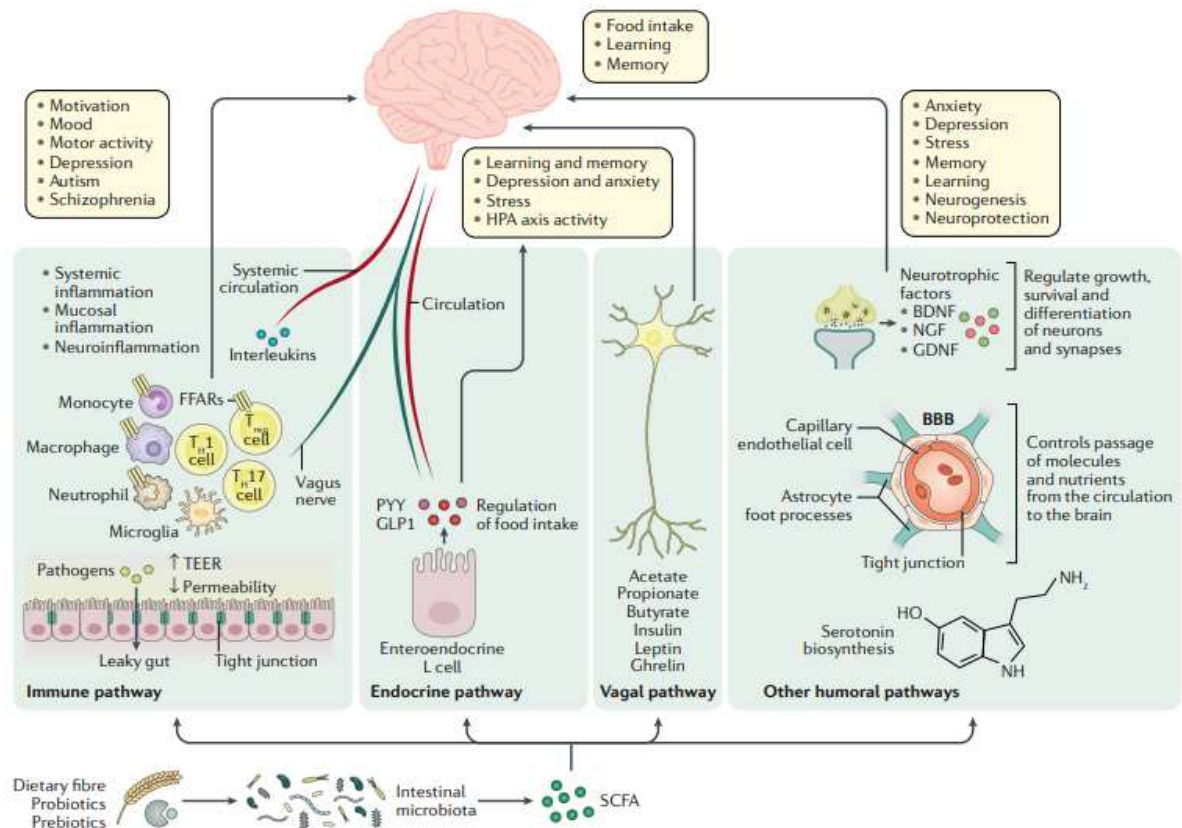
Em fração reduzida, chegam à circulação periférica nas proporções 22–42 µM (acetato), 0,9–1,2 µM (propionato) e 0,3–1,5 µM (butirato) onde podem alcançar outros tecidos periféricos como o cérebro (GONZALEZ et al., 2018). Além disso, uma parcela menor dos AGCC produzido no reto pode contornar o fígado e atingir diretamente a

circulação sistêmica através da veia íliaca interna (VAN DER BEEK et al. 2017; MCLOUGHLIN et al. 2017).

Os AGCC atuam como ligantes endógenos de receptores transmembranares GPCRs, renomeados como free fatty acids receptors (FFARs), que ativam diferentes respostas locais e podem alcançar a sinalização cerebral através da ativação direta com o nervo vago. De maneira intracelular, os AGCC afetam a expressão gênica, especialmente como HDACi (DALILE et al., 2019).

Os AGCC podem influenciar o eixo intestino-cérebro direta ou indiretamente por meio de vias imunes, endócrinas, vagais e outras vias humorais (Figura 2). Através da via imune, os AGCC interagem localmente com células imunes intestinais, como monócitos e neutrófilos, através dos receptores (FFARs) ou inibindo as histonas desacetilases. Por sua vez, esses processos podem influenciar a imunidade da mucosa intestinal e a função de barreira (DALILE et al., 2019).

Figura 2 – Potenciais vias de interação dos AGCC com o cérebro (Dalile et al., 2019)



Periféricamente, os AGCC interagem com uma variedade de células imunes através da regulação, recrutamento, diferenciação e ativação de macrófagos e outras células imunes, influenciando a estrutura, função e ativação da micróglia. Por influenciarem o funcionamento da micróglia, os AGCC afetam a emoção, a cognição e a fisiopatologia de distúrbios neurológicos (DALILE et al., 2019). Por interagirem diretamente com as células imunes, os AGCC também influenciam a inflamação sistêmica por regularem a produção central de citocinas inflamatórias como TNF- α e a quimiotaxia dessas células (RODRIGUES et al., 2016) (Figura 2).

O propionato regula a população de células Treg e, conseqüentemente, reduz a reação imune sistêmica, melhorando a neurodegeneração e outras doenças crônicas (DUSCHA et al., 2020). Alterações nas células Treg desempenham um papel fundamental em doenças neuroinflamatórias autoimunes, como a Esclerose Múltipla (EM) (KLEINWIETFIELD & HAFLE, 2014). Administração oral de ácido propiônico (PA) em indivíduos com EM desempenhou efeitos imunomoduladores benéficos, além do efeito neuroprotetor sugerido pela maior disponibilidade de PA no líquido cefalorraquidiano, alteração na estrutura da substância cinzenta e melhores resultados clínicos (DUSCHA et al., 2020).

Através da via endócrina, o butirato promove a síntese dos hormônios intestinais GLP-1 e o PYY nas células enteroendócrinas (LIU et al., 2018). Esses hormônios possuem sinalização com o cérebro através da circulação sistêmica ou vias vagais que resultam em efeitos anorexígenos (XIONG et al. 2022). Esses hormônios podem, por sua vez, influenciar aprendizagem, memória e humor em camundongos (CANTU-JUNGLES, RASMUSSEN AND HAMAKER 2019; LIU et al. 2018).

Os AGCC também são capazes de modular os níveis de fatores neurotróficos no cérebro e melhorar funções cerebrais. Zheng et al. (2021) revelaram que a deficiência de acetato a longo prazo diminuiu os níveis da proteína SYP, marcadora de sinaptogênese associada a memória e aprendizado no hipocampo de ratos. A suplementação de acetato ou o transplante fecal da microbiota reestabeleceu os níveis de proteína SYP no hipocampo dos animais (ZHENG et al., 2021). Esse resultado indica que a deficiência de acetato, a longo prazo, como um fator de risco para o declínio cognitivo.

O propionato afetou as regiões do SNC implicadas na recepção de sinais da área portal através das vias vagais e espinais. Especificamente, este estudo descobriu que a administração de propionato promoveu a ativação neuronal em diferentes áreas do complexo vagal dorsal e em regiões do cérebro como hipotálamo e núcleo paraventricular (DE VADDER et al., 2014).

O butirato de sódio aumentou os níveis de fatores neurotróficos cerebrais como BDNF (brain derived neurotrophic factor) e fatores neurotróficos derivado de células da glia (GDNF) no hipocampo de roedores com infecções cerebrais. Esses benefícios foram associados com melhora no aprendizado e memória (BARICHELLO et al. 2015; DA SILVA et al. 2012).

Além disso, os AGCC podem contribuir para a síntese de serotonina (Figura 2). Acetato e butirato promoveram a transcrição da enzima triptofano hidroxilase 1 (enzima limitante para a síntese de 5-HT na mucosa intestinal) em um modelo de células enterocromafins humana, sugerindo que os AGCC podem estar crucialmente envolvidos na produção entérica de 5-HT e, possivelmente aumentar os níveis de triptofano circulante e, conseqüentemente, a síntese de serotonina central (REIGSTAD et al., 2015).

Butirato e os outros AGCC podem atravessar a BHE provavelmente por meio de transportadores monocarboxilatos localizados nas células endoteliais e influenciam a integridade da BHE inibindo vias associadas com respostas inflamatórias (Figura 2). Camundongos germ-free apresentaram expressão reduzida das proteínas como claudina e ocludina, levando aumento da permeabilidade da BHE. Após a recolonização com *Clostridium tyrobutyricum*, produtora de butirato, ou após a administração de butirato de sódio os camundongos recuperaram a integridade da BHE por regular positivamente a expressão das proteínas de junção epitelial (BRANISTE et al., 2014).

Semelhante a esse resultado, o tratamento de um modelo *in vitro* de células endoteliais cerebrovasculares protegeu a BHE contra rupturas induzidas por LPS nas proteínas de junção ocludina, claudina-5 e ZO-1 (HOYLES et al., 2018). Ainda, estudos demonstram que após injúria cerebral, a administração intravenosa ou intraperitoneal de

butirato de sódio é capaz de prevenir a disrupção da BHE e promover a neurogênese (LI et al., 2016; LIU et al., 2018).

Em camundongos, o acetato captado pela BHE alterou os níveis dos neurotransmissores glutamato, glutamina e GABA no hipotálamo e aumentou a expressão do neuropeptídeo anorexígeno, favorecendo a redução do apetite e do peso corporal (FROST et al., 2014). Estas observações sugerem que o acetato tem um papel direto na regulação central do apetite. Além disso, níveis mais baixos de acetato foram observados em pacientes depressivos e estão associados com redução do ácido butírico (CAPUCO et al., 2020).

Dentre os AGCC, o butirato se destaca nos estudos de psicobiologia, principalmente na sua forma farmacológica como butirato de sódio (NaB). O NaB regula a expressão gênica no cérebro por meio da sua ação como HDACi, resultando em diversos efeitos benéficos para a saúde cerebral que vão desde regulação no funcionamento da micróglia em doenças neurodegenerativas até melhoras de sintomas comportamentais e cognitivos (MATT et al., 2018).

Finalmente, como já mencionado, os AGCC exercem uma série de efeitos locais que melhoram a defesa e saúde intestinal. Os AGCC aumentam a integridade da barreira epitelial intestinal por regular positivamente a expressão das proteínas de junção (occludina, zonulina e claudinas), aumentar a resistência elétrica transepitelial (TEER), a produção de muco, a mobilidade e a imunidade do TGI (DALILE et al., 2019; LEWIS et al., 2010) (Figura 2). Essas ações locais protegem contra a inflamação por aprimorar a barreira intestinal e conter a translocação de bactérias e/ou fragmentos bacterianos, evitando ativação neuromine e sendo crucial para a saúde cerebral (HOOGLAND et al., 2015; VARATHARAJ & GALEA, 2017).

3.3 Kefir

O Kefir de leite é um produto fermentado obtido a partir da fermentação do leite pelos grãos de kefir e é tradicionalmente produzido pela inoculação dos grãos de kefir com o leite de vaca, resultando em uma com pH ácido, variando de 3,3 a 5,5, levemente

carbonatada e com pequeno teor de álcool (ISMAIEL, GHALY AND EL-NAGGAR, 2011) (Figura 3). Como produto lácteo fermentado, a microbiota natural do kefir é composta por vários gêneros principalmente as bactérias ácido-láticas (BAL), ácido-acéticas, leveduras e *Lactobacillus spp* sendo geralmente um gênero dominante (GAROFALO et al. 2020; ZENG et al. 2022).

Os grãos de kefir são massas gelatinosas e possuem formato irregular, variando de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro (AL-MOHAMMADI et al., 2021). Esses grãos apresentam uma composição complexa e específica de microorganismos probióticos, incluindo diferentes espécies de BAL e bactérias ácido-acéticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e *Acetobacter* e leveduras, que vivem em simbiose em uma matriz de polissacarídeos (kefiran) (ARSLAN, 2015; CHEN, WANG AND CHEN, 2008; MAGALHÃES et al., 2011).

Figura 3 – Grãos de kefir e bebida fermentada



Fonte: Disponível em: <https://s1.static.brasilecola.uol.com.br/img/2019/09/graos-de-kefir.jpg/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

Os grãos de kefir também fermentam outros tipos de leite, incluindo os de origem vegetal, além de sucos de frutas (AL-MOHAMMADI et al., 2021). A composição e conteúdo da microbiota dos grãos de kefir ou da bebida variam de região para região de

acordo com o produto e a cultura utilizados para iniciar a fermentação (PRADO et al., 2015).

Evidências crescentes comprovam que o kefir tem uma variedade de ações probióticas e, além de modular a microbiota intestinal, tem ação imunomoduladora, hipoglicemiante, hipotensiva, hipolipemiante, antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória, cardioprotetora e neuroprotetora (PELUZIO et al., 2021; CHEN et al., 2022).

Probióticos são microorganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde (FAO/WHO, 2002). Esses microorganismos modulam o microbioma intestinal, contribuindo para o estado de eubiose, aumento da população de bactérias produtoras de AGCC e outros metabólitos saudáveis, melhora da função imune e defesa intestinal (MARKOWIAK-KOPEĆ & ŚLIŻEWSKA, 2020; CHEN et al., 2022).

Lactobacillus paracasei, cepa isolada do kefir, demonstraram tolerar o ambiente ácido gastrointestinal e, aderir ao epitélio intestinal onde são capazes de produzir lactato, que é utilizado pelas bactérias para produção de AGCC e outros metabólitos saudáveis (BENGOA et al., 2018). Akar et al. (2021) demonstraram que o tratamento com o kefir mudou a composição da microbiota fecal, aumentou a expressão de ocludina e claudina-1 no intestino, o que foi associado com melhora de função de barreira intestinal e redução de marcadores inflamatórios como NF-kB em ratos alimentados com uma dieta rica em frutose (AKAR et al., 2021).

Em relação à modulação da microbiota intestinal, o kefir ou suas cepas demonstraram melhorar a composição da microbiota intestinal por aumentar as concentrações de famílias benéficas como *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bifidobacterium* e reduzir as concentrações de *Proteobacteria* e *Enterobacteriaceae*, famílias consideradas patogênicas (KIM et al., 2015). Esse efeito pode ser atribuído a uma combinação de fatores como inibição direta de patógenos por ácidos e produção de bacteriocina, além da exclusão competitiva de patógenos na mucosa intestinal (AL-MOHAMMADI et al., 2021).

Além dos efeitos relacionados a microbiota probiótica, o kefir, como produto fermentado, é composto pelos seus próprios metabólitos e componentes bioativos como

os AGCC, EPS, peptídeos bioativos, fenóis, álcoois, ácidos orgânicos, vitaminas, bacteriocinas e outros componentes que também possuem ação probiótica com atividade antiinflamatória, antioxidante, hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva, anticancerígena, e antidepressiva (AL-MOHAMMADI et al., 2021; TALIB et al., 2019).

Medrano et al. (2020) descobriram que a fermentação de kefir induziu acidificação através da produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido acético após 24 horas de fermentação, ácido propiônico após 48 horas de fermentação e aumento significativamente o ácido butírico após 48 horas de fermentação, o que inibiu a proliferação de células tumorais de câncer de cólon.

Seo et al. (2018) descobriram que o EPS produzido pela fermentação do kefir teve efeito de reduzir a doença inflamatória intestinal. Além disso, a administração oral de kefir aumentou o número de produtores de IgA na lâmina própria intestinal, reforçando a imunidade do intestino (VINDEROLA et al., 2005).

Os peptídeos do kefir inibiram a sinalização do NF-Kb e a produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , ao passo que aumentou a produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória (CHEN, et al., 2019; TON et al., 2020b). Em adição, *Lactobacillus rhamnosus* RC007, cepa probiótica isolado do grão de kefir, aumentou a razão de citocinas antiinflamatórias e pró-inflamatória (IL-10/ TNF- α) no fluido intestinal de camundongos após 10 dias de tratamento (DOGI et al., 2016).

O kefir também demonstrou aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) e diminuir espécies reativas de oxigênio (EROS) (ALI et al., 2020; BARBOZA et al., 2018). Desse modo, o kefir é um produto com capacidade de proteger as células contra as EROS, preservando lípidos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, evitando o processo de apoptose celular (PEREIRA et al., 2021).

Os efeitos positivos do kefir sobre a modulação da microbiota intestinal e inflamação intestinal tem sido associados principalmente com as ações antimicrobianas, produção de AGCC e ação imunoreguladora intestinal, e não associados em relação a estabilidade da microbiota do kefir visto a sua dificuldade de padronização. Portanto, é

comum o estudo de cepas isoladas do kefir como mencionados acima, mas há poucos estudos sobre a interação entre o kefir e outros sítios de interação como o cérebro.

3.4 Kefir: um psicobiótico

Evidências clínicas sugerem que a redução da disbiose representa uma hipótese de atuação do kefir na prevenção e no tratamento adjuvante de doenças e distúrbios neurodegenerativos e/ou comportamentais. De fato, alguns estudos associam o consumo do kefir com aumento de bactérias benéficas, melhora de variáveis cognitivas, inflamatórias, neuroimunes, neuroendócrinas e comportamentais (GUVEN et al., 2015; NOORI et al., 2014; SUN et al., 2019; VAN DE WOUW et al., 2021).

A suplementação de *Lactobacillus kefiranofaciens* (ZW3), resultou em melhora do comportamento depressivos e ansioso via metabolismo do triptofano, proteção do eixo HPA e inibição da inflamação em animais induzidos ao estresse (SUN et al., 2019b). Além disso, o ZW3 aumentou os microorganismos com ação antiinflamatória e antioxidante como *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Lachnospiraceae*, *Coriobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* e *Akkermansia*, e reduziu os níveis de microorganismos associados a doenças e ao estresse como *Proteobacteria* nas fezes dos ratos (SUN et al., 2019b).

Semelhantemente, Noori et al. (2014) indicaram que o kefir tem o potencial de proteger contra a depressão, ansiedade e comprometimento cognitivo em um modelo animal induzido pela cessação da nicotina. Além disso, a administração de 150 mg/kg de peptídeos do kefir dissolvidos em água exibiram atividade antidepressiva que foi associada com a regulação positiva de BDNF no hipocampo de camundongos, além do aumento dos níveis de serotonina (CHEN et al., 2021). O kefir também melhorou comportamentos repetitivo, de recompensa, sinalização serotoninérgica, déficits induzidos e aumentou a prevalência de *Lactobacillus reuteri*, cepa que confere uma série de benefícios ao metabolismo e imunidade do hospedeiro, além de estar associada a produção de GABA, neurotransmissor inibitório do SNC e com efeitos anti-depressivos (VAN DE WOUW et al., 2020).

Além disso, o consumo de kefir (0.2 ml) por três semanas reduziu deficiências comportamentais e melhorou a imunorregulação periférica através da modulação do eixo intestino-microbiota-cérebro em modelo de camundongo de TEA, sugerindo que o consumo de kefir pode ser uma estratégia viável para modular sintomas específicos do TEA (VAN DE WOUW et al., 2021)

A suplementação do kefir por 90 dias reduziu espécies reativas de oxigênio, levando a atenuação da oxidação de proteínas, citocinas inflamatórias e processo apoptótico em pacientes com Alzheimer, ao mesmo tempo que melhorou variáveis cognitivas (TON et al., 2020).

Neste sentido, o kefir pode modular aspectos do eixo intestino-microbiota-cérebro através das propriedades bioativas que podem atingir o cérebro sistematicamente ou através da modulação da microbiota intestinal e seus metabólitos, capazes de interagir via nervo vago e outras vias humorais.

Desse modo, o kefir se apresenta como um psicobiótico, que é toda intervenção direcionada à microbiota que influencia a relação microbiota-cérebro (SARKAR et al., 2016). Apesar do kefir se incluir na definição de psicobiótico, segundo nosso conhecimento, não há estudos que avaliam o efeito do seu consumo sobre a neuroproteção preventiva em modelo de inflamação intestinal.

Como supracitado, a inflamação intestinal é um fator de risco para a neuroinflamação por promover alterações no eixo intestino-microbiota-cérebro. Portanto, torna-se relevante investigar se o consumo de kefir previne possíveis danos cerebrais nesse modelo.

3.5 Interleucina 10 e inflamação intestinal

A IL-10 é uma citocina produzida por vários tipos de células imunes, incluindo os linfócitos T CD4+, T CD8+, linfócitos B, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, natural killers entre outras (SABAT et al., 2010).

Essa interleucina funciona como um inibidor chave central das funções das células apresentadoras de antígenos e, portanto, suprime as respostas das células T efetoras

desencadeando respostas antiinflamatórias (LIU, TONKONOGY AND SARTOR, 2011; MISHIMA et al., 2019).

Animais deficientes em IL-10 e/ou do receptor de IL-10 (IL-10-R) desenvolvem espontaneamente inflamação no intestino delgado e/ou grosso (enterocolite) podendo desenvolver doença de Chron, colite ulcerativa e outras doenças inflamatórias intestinais (ASSEMAN et al., 1999).

A IL-10 é uma das citocinas anti-inflamatórias mais relevantes na formação das respostas imunes da mucosa intestinal. De fato, a IL-10 pode modular a produção de IgA, que tem como papel proteger a barreira intestinal através da modulação da comunidade microbiana residente, restringindo o crescimento de patógenos bacterianos e aumentando a imunidade protetora do hospedeiro via exclusão imunológica (DORON et al. 2021).

Camundongos *knockout* IL-10 desenvolvem colite ulcerativa mediada por Th1/Th17 na presença da microbiota intestinal residente (BERG et al., 1996; YEN et al., 2006). Já a administração de IL-10 recombinante previne o aparecimento da enterocolite experimental, melhora a função de barreira intestinal e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias pela microbiota (BERG et al., 1996; WU et al., 2016). Esses resultados sugerem que a IL-10 previne a disbiose e a inflamação intestinal que, por sua vez, pode prevenir a inflamação sistêmica e a neuroinflamação.

A deficiência de IL-10 também está associada a prejuízos na mitofagia (degradação seletiva das mitocôndrias pela autofagia), dano mitocondrial, aumento na produção de EROS e ativação aberrante do inflamassoma após estimulação do LPS (IP et al., 2017). Esse resultado indica que a IL-10 previne a inflamação intestinal, pelo menos em parte, via promoção da mitofagia para limitar a ativação do inflamassoma e respostas inflamatórias (IP et al., 2017).

Autofagia é fundamental para a manutenção da homeostase intestinal, regulação da ecologia intestinal, aprimoração das respostas imunes intestinais e proteção antimicrobiana (LARABI; BARNICH AND NGUYEN, 2020).

Ao contrário dos animais *knockout* de IL-10 com microbiota intestinal residente, animais *germ-free knockout* de IL-10 não desenvolvem inflamação intestinal (BERG et

al., 1996). Portanto, a sinalização antiinflamatória intestinal de IL-10 parece depender, pelo menos em parte, da microbiota intestinal. De fato, a bactéria comensal *Bacteroides fragilis* secreta a molécula imunorreguladora A que desencadeia ativação de células FOXP3+ T reg produtoras de IL-10, protegendo camundongos da colite experimental (SHEN et al., 2012).

Animais *germ-free* recolonizados por uma cepa de bactéria não patogênica (*Escherichia coli*) responde inicialmente, de maneira rápida, com produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (WU et al., 2016). Esta resposta progride para um perfil imunológico regulado com redução de IFN- γ , IL1 β , IL6 na presença da ativação bacteriana sustentada pela imunorregulação de IL-10 (WU et al., 2016). Logo, a sinalização intestinal de IL-10 na presença da microbiota saudável ativa a homeostase imunológica, culminando na redução de citocinas pró-inflamatórias (WU et al., 2016).

Portanto, a sinalização intestinal de IL-10 é um fator chave na supressão da resposta imune efetora da mucosa do hospedeiro a componentes bacterianos residentes, tornando peça fundamental para a homeostase imunológica intestinal e sistêmica. Além disso, os probióticos parecem melhorar a expressão da IL-10 e seus efeitos de proteção intestinal.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito neuroprotetor do consumo de kefir de leite em camundongos *knockout* de IL-10 e revisar os mecanismos moleculares do butirato, um metabólito do kefir, nas funções cerebrais.

4.2 Específicos

Avaliar o efeito do consumo de kefir:

- Na concentração de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, butírico) no cérebro;

- Na expressão das proteínas de junção epitelial (ZO-1, ocludina, claudina-5) no cérebro;
- Na concentração das citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, , IL17a, IFN- γ) no cérebro;
- Na concentração das enzimas envolvidas no estresse oxidativo (super óxido dismutase, catalase e glutionato s transferase) no cérebro;
- Na concentração da peroxidação lipídica (malondialdeído) no cérebro;
- Nas análises histológicas do intestino delgado.

Revisar os mecanismos moleculares do butirato:

- Produzido pela fermentação bacteriana no cólon nas funções cerebrais;
- Farmacológico (NaB) nas funções cerebrais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O presente projeto é parte integrante de um projeto guarda-chuva intitulado “Resposta inflamatória, antioxidante e alteração intestinal em modelo murino C57BL-6 consumindo kefir de leite desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium” que foi previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sendo aprovado sob o número de protocolo 35/2020 (Anexo 7.1).

5.2 Material de trabalho

Foram utilizados tecidos cerebral e intestinal de 20 camundongos C57BL-6 selvagem e *knockout* IL-10. Ambos tecidos são de animais com oito semanas de idade do gênero masculino obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

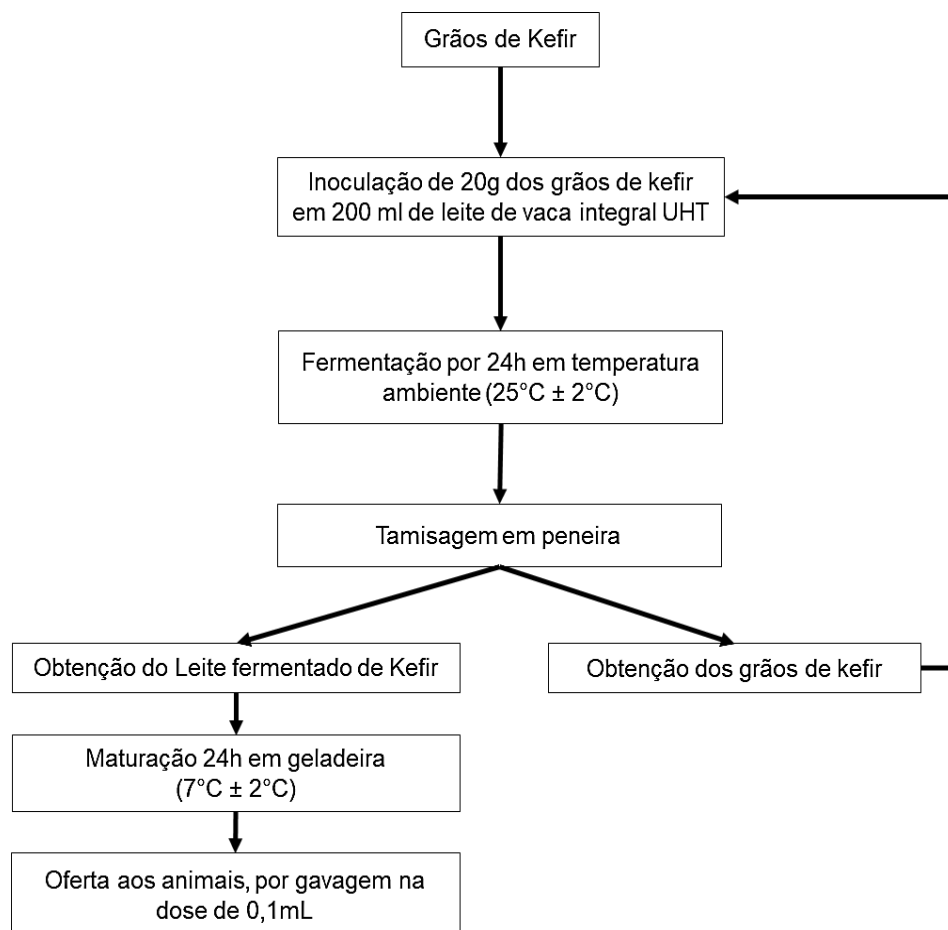
5.3 Preparo do Kefir

Os grãos de kefir utilizados no estudo foram obtidos de um domicílio, cidade de Viçosa, localizada na região da zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil, no qual tradicionalmente a família fazia o seu consumo regularmente. A produção da bebida kefir foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional - LABIN, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV). Primeiramente, os grãos foram ativados e cultivados diariamente durante algumas semanas, a fim de se obter a quantidade necessária para todo o ensaio experimental (tratamento dos animais).

Em seguida, para a produção do kefir de leite, os grãos foram separados em porções de 20g, inoculados em recipiente de vidro estéril, na concentração de 10% m/v em leite de vaca integral (200mL), UHT. Este leite foi obtido do comércio local, marca e lotes únicos (Cotochés integral, lote MG1 AM 5), mantido em temperatura ambiente, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, sem agitação, em meio aeróbio (Figura 4).

Posteriormente, os grãos que foram recuperados por tamisagem em peneira de aço inoxidável e lavados com água destilada foram inoculados ao leite novamente, repetindo as etapas descritas para uma nova produção de kefir. Na sequência, o leite fermentado do kefir produzido, procedeu à maturação, sob refrigeração a $7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, e em seguida, foram administrados oralmente, via gavagem, para os animais experimentais.

Figura 4 – Fluxograma de preparo do kefir de leite

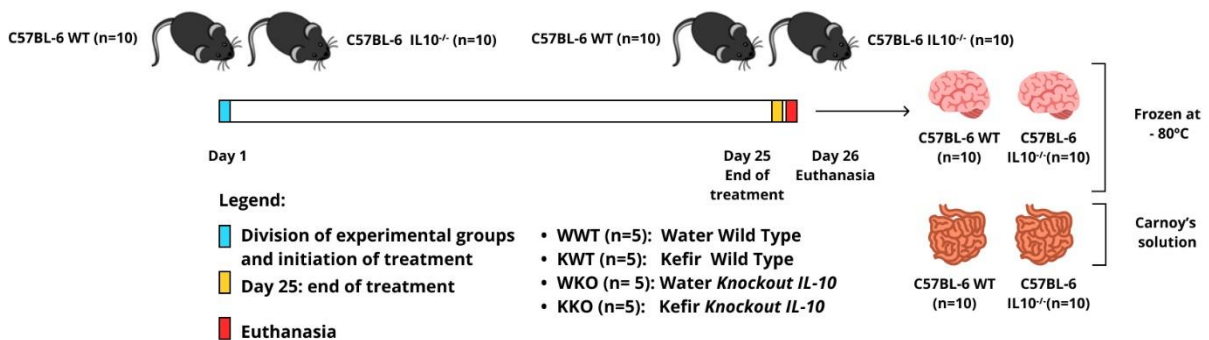


5.4 Desenho experimental

O experimento possui 4 grupos experimentais, com 5 animais cada, sendo estes: grupo selvagem e água (WWT), que recebeu dieta comercial e gavagem com água filtrada; grupo selvagem e kefir (KWT), que recebeu dieta comercial e gavagem com kefir de leite; grupo *knockout* IL-10 e água (WKO), que recebeu dieta comercial e gavagem com água filtrada; grupo *knockout* IL-10 e kefir (KKO), que recebeu dieta comercial e gavagem com kefir de leite (Figura 5). Todos animais do grupo água receberam 0,1 ml/dia e todos os animais do grupo kefir receberam (0,1ml/dia -10⁹ UFC/ dia).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno cobertas com grades metálicas, em ambiente com temperatura (22 ± 2°C) e umidade controladas (60-70%) assim como ciclo claro/escuro de 12 horas. Além do tratamento de cada grupo, água filtrada e dieta comercial foram fornecidas *ad libitum* por 25 dias, período total do desenho experimental.

Figura 5 – Delineamento experimental (Adaptado de Albuquerque et al., 2023 *in press*)



O procedimento de eutanásia foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional (LABIN) do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, em ambiente tranquilo e adequado, longe do alojamento e de outros animais experimentais.

A eutanásia foi realizada por uma equipe treinada e capacitada. Os animais foram anestesiados de 3 a 5 minutos com Isoflurano, utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio (3% até 5% mistura de Isoflurano e oxigênio).

Durante o procedimento da eutanásia, foram removidos o cérebro e intestino delgado que foram pesados e congelados em ultra freezer -80°C para análises

posteriores. O intestino delgado foi lavado e fragmentado em uma porção armazenada em solução de Carnoy para análises histológicas. Todos os procedimentos foram realizados com o objetivo de propiciar uma morte humanitária aos animais, em consonância com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.5 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Segundo metodologia adaptada de Siegfried e colaboradores (1984), os ácidos graxos foram extraídos de uma alíquota (100mg) de cérebro congelado. Para a extração, os tecidos foram homogenizados com água ultra pura seguidos da adição de hidróxido de cálcio, sulfato cúprico, agitação em vórtex e congelamento. Em seguida as amostras foram descongeladas e centrifugadas, o sobrenadante reservado, adicionou-se ácido sulfúrico concentrado e novamente, com posterior congelamento. Finalmente, descongelado e centrifugado, sendo então o sobrenadante final filtrado em filtro (0,22mm) e acondicionado em vial.

Após a extração, a quantificação das concentrações dos ácidos graxos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo SHIMADZU (SHIMADZU do Brasil, São Paulo-SP), acoplado ao detector ultravioleta (UV) modelo SPD-20A VP. Foi utilizado comprimento de onda de 210 nm, coluna HPX 87H (Aminex®), 300cm x 7,8mm e pré coluna de mesma fase (Bio-Rad Laboratórios Brasil, Rio de Janeiro-RJ), fluxo da corrida 0,6 mL/minuto, duração da corrida 50min, pressão na coluna de 75 KgF, temperatura do forno 32°C, o volume injetado foi de 10 µL e a fase móvel água acidificada (0,005 M de ácido sulfúrico).

A obtenção dos dados foi realizada através do software Lab Solutions, Shimadzu Corporation (2013) e os dados foram expressos em µmol/g cérebro.

5.6 Determinação da expressão gênica de proteínas de junção epitelial

5.6.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA de alíquotas (100mg) de cérebro, utilizou-se o protocolo adaptado do reagente Trizol (Invitrogen®). Foi adicionado 1 ml de Trizol (Invitrogen®) aos microtubos contendo as alíquotas de cérebro que foram

armazenados no nitrogênio líquido até serem colocados no homogenizador TissueLyser II (Qiagen®) com beads de aço inoxidável previamente higienizadas com RNase Away (Sigma®) durante 1 minuto, pausado nos 30 segundos para uso de nitrogênio líquido, na frequência 28 (1/s). Após a homogeneização do tecido cerebral, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante transferido para novos microtubos de 1,5 mL. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, agitou-se por 15 segundos manualmente e incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente. As fases foram separadas por centrifugação a 12000 g, 4 °C por 15 minutos e a partir da fase aquosa, contendo o RNA, foram retirados aproximadamente 400 µL de homogenato e transferidos para outro tubo. O RNA foi precipitado mediante a adição de 400 µL de isopropanol e após 30 minutos de incubação a – 20°C, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 300 µL de etanol 75% e centrifugado novamente a 7500 g, 4 °C por 5 minutos.

Finalmente, o precipitado, previamente seco em cabine de segurança biológica, foi dissolvido em 20 µL de água livre de nuclease e incubado em banho seco na temperatura de 55°C por 7 minutos. A concentração do RNA foi estimada através da leitura no Qubit Fluorometer (Thermo Fischer®) e a integridade foi avaliada em gel de agarose a 1%.

5.6.2 Tratamento do RNA com Dnase

A fim de evitar possíveis contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase de acordo com as recomendações do fabricante (Promega®). Resumidamente, foram adicionados 1 µL de tampão de reação, e 2 µL de Dnase para cada amostra de RNA a ser tratada (1-6 µL), sendo que o volume da reação foi completado com água nuclease free para um volume total de 10 µL e elas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, inativadas com a adição da DNase Stop Solution (1 µL) e foram incubadas por 10 minutos a 65°C. O tratamento foi confirmado por reações de amplificação (PCR) utilizando o primer para o gene endógeno GAPDH.

5.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para esta etapa, foi utilizado o Kit High Capacity™ cDNA reaction (Applied Biosystems®), a partir do uso de Oligo dt primer como iniciadores da síntese. Inicialmente, foi preparado o mix de reagentes, seguindo instruções conforme manual do kit. Utilizou-se 10 µL de amostra de RNA e 10 µL dos componentes do kit, totalizando 20 µL finais de reação. Para as condições de ciclagem, foi utilizado o equipamento 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®). A ciclagem da reação de síntese de cDNA foi realizada inicialmente a temperatura de 25°C por 10 minutos (etapa inicial), seguido de 37°C por 120 minutos (etapa da ativação da enzima transcriptase reversa), finalizado por 85°C durante 5 minutos (etapa de inativação da enzima transcriptase reversa).

5.6.4 PCR em tempo real (qPCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata de acordo com as recomendações do kit GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (Promega®). Utilizou-se 2µL (100ng) do cDNA, 1µL (1µM) dos primers direto e reverso, específicos para os genes da ocludina, zonulina 1 (ZO-1) e claudina-5, 5,0 µL do GoTaq qPCR Master Mix 2x (Promega®) e 2 µL de água nuclease free ,obtendo-se o volume final de 10,0 µL. As reações foram realizadas em uma placa de 48 poços utilizando-se o equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

As condições utilizadas para a amplificação foram 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Após os 40 ciclos, a temperatura foi aumentada gradualmente, em incrementos de 1 °C, começando em 60 °C até atingir o limite de 95 °C, resultando na geração de uma curva de melting.

A eficiência de amplificação para cada primer foi determinada pela curva padrão através de uma diluição seriada de 1:2 de cDNA variando de 50ng a 0,78 ng e calculada pela fórmula eficiência de PCR = $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$. A curva padrão foi utilizada para calcular os valores de quantidade relativa de cada amostra para cada gene (MENDES et al., 2013)

As quantidades das amostras foram normalizadas pelo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Tabela – 1 Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no cérebro

Gene	Sequência forward	Sequência reverse
GAPDH	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTCCACACCGA
Claudina 5	GCTCTCAGAGTCCGTTGACC	CTG CCC TTT CAG GTT AGC AG
ZO-1	CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTC	TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC
Ocludina	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT

Fonte: Volynets et al. (2016)

5.7 Análise de citocinas

As concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17a, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) foram avaliadas utilizando kit Cytometric Bead Array (CBA)(BD™), segundo recomendações do fabricante, com modificações, conforme descritas a seguir. Amostras do tecido cerebral foram homogeneizadas com auxílio de um homogeneizador de tecido (IKA®, model T10 basic) em tampão fosfato pH 7, mantidos no gelo e, posteriormente centrifugadas a 12000 g, 4 °C por 10 minutos .

O sobrenadante foi coletado. As beads foram diluídas com solução diluente e distribuídas em microtubos. Em cada microtubo foram adicionados 25 μ L de amostra e 25 μ L da solução detectora, seguido de incubação por 2 horas na ausência de luz. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL da solução de lavagem, seguido de centrifugação sob refrigeração a 2000g por 5 minutos, e desprezado parte do sobrenadante (aproximadamente 700 μ L). O volume restante foi utilizado para leitura no citômetro de fluxo (aproximadamente 300 μ L). Foi construída uma curva padrão com dez pontos partindo da solução mais concentrada, top standard. Os resultados foram expressos em pg/g de tecido. Os dados foram processados no Software FCAP Array versão 3.0.

5.8 Análise das enzimas envolvidas no processo oxidativo

5.8.1 Catalase (CAT)

As alíquotas de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1M, pH 7), centrifugadas a 12000 g, 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante coletado. A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia de Aebi (1984), a partir do sobrenadante pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (10 mmol/L),

durante 60 segundos, com leitura em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific®) a 240nm. Os resultados foram expressos em unidades (U) de CAT/mg de proteína sendo a dosagem de proteína realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

5.8.2 Superóxido Dismutase (SOD)

Com os mesmos sobrenadantes utilizados para a dosagem da CAT, foi determinado a atividade da SOD, segundo Dieterich e colaboradores (2000). Essa metodologia é baseada na capacidade da SOD em catalisar a reação do superóxido O_2 à peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a razão de auto oxidação do pirogalo. A análise foi realizada em triplicata, em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific®, Finlândia) a 570nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína sendo a dosagem de proteína realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

5.8.3 Glutathione S Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada segundo metodologia adaptada de Habig e colaboradores (2002), baseando na habilidade da GST em metabolizar o 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) conjugando com a glutathione reduzida (GSH). A análise foi realizada com os sobrenadantes anteriormente descritos para CAT e SOD, acrescido de CDNB e GSH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific®, Finlândia) a 340nm, durante 90 segundos. O coeficiente de extinção molar de 9,6 mmol/cm foi usado para calcular a concentração da GST, sendo essa expressa em nmol/min/mg de proteína da amostra.

5.9 Mensuração da peroxidação lipídica

A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Buege e Aust (1978). O método baseia-se na capacidade do malondialdeído (MDA), em condições ácidas e aquecido com o TBARS, de formar um produto de coloração rósea, que pode ser mensurado em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific®, Finlândia) a 535nm.

Amostras de cérebro (100 mg) foram homogeneizadas com PBS 50 mmol/L e centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante resultante foi acrescido solução de TBARS, que contém ácido tricloroacético e tiobarbitúrico. O mesmo foi mantido em banho-maria a 100 °C por 10 minutos.

O coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5$ M/cm foi usado para o cálculo da concentração de TBARS e a dosagem de proteína foi realizada por método de Lowry e colaboradores (1951). A concentração final foi expressa em micromol/mg de proteína.

5.10 Análises histológicas do intestino delgado

Fragmentos do intestino delgado foram removidos e armazenados, por no mínimo 24 horas, em solução de Carnoy em temperatura ambiente. Em seguida, esses tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70% até álcool absoluto) e incluídos em parafina. Secções transversais e longitudinais de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM2155, Leica®), com auxílio de navalhas de vidro e coradas em solução de Hematoxilina e Eosina (HE).

Para a análise morfométrica, imagens dos fragmentos histológicos foram capturadas com objetiva de 10X diretamente no microscópio de luz (Primo Star 2012, Zeiss®, Alemanha) por meio de uma câmara de vídeo Aixo ERc5s (Zeiss®, Alemanha). Com o auxílio do software Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics) foram realizadas as seguintes medidas:

- Altura das vilosidades: foram selecionados 10 campos aleatórios por animal e apenas as vilosidades com epitélio definido e conjuntivo visível foram aferidas;
- Largura das vilosidades: nas mesmas vilosidades utilizadas na análise de altura foram feitas 3 medidas (região apical, média e basal), considerando-se o valor médio dessas três medidas;
- Profundidade das criptas: foram tomadas as medidas de 10 campos por animal, sendo possível ver a base e o ápice (abertura) da cripta.
- Área da superfície da vilosidade foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Área da superfície da vilosidade} = 2\pi \times \frac{VW}{2} \times VL$$

Onde \bar{v} é a média das três medidas de largura da vilosidade e VL é a altura da vilosidade (Agarwal et al., 2022).

5.11 Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada primeiramente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparação dos quatro grupos experimentais, em caso de distribuição simétrica dos dados, foi utilizada a análise de variância (*One Way ANOVA*), seguida pelo teste complementar de comparações múltiplas de Tukey. Em contrapartida, para os dados com distribuição assimétrica foi realizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste complementar de comparações múltiplas de Dunn's.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* versão 8.3.0 compatível com o sistema operacional Windows 10 (San Diego, Califórnia, USA) assumindo um $p < 0,05$.

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, para os dados paramétricos, e em mediana \pm intervalo interquartilico, para os dados não paramétricos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAQ, Reem et al. Microbiome–microglia connections via the gut–brain axis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 216, n. 1, p. 41-59, 2019.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods of Enzymology*. v. 105, p. 121-127, 1984.

AGARWAL, Nikita et al. Comparing the Effects of Concord Grape (*Vitis labrusca* L.) Puree, Juice, and Pomace on Intestinal Morphology, Functionality, and Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3539, 2022.

AGUS, Allison; PLANCHAIS, Julien; SOKOL, Harry. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 6, p. 716-724, 2018.

AKAR, Fatma et al. Potential mechanistic pathways underlying intestinal and hepatic effects of kefir in high-fructose-fed rats. **Food Research International**, v. 143, p. 110287, 2021.

ALI, Ola Sayed M. et al. Ameliorative effect of kefir against γ -irradiation induced liver injury in male rats: Impact on oxidative stress and inflammation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 28, p. 35161-35173, 2020.

AL-MOHAMMADI, Abdul-Raouf et al. Chemical constitution and antimicrobial activity of kefir fermented beverage. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2635, 2021.

ARSLAN, Seher. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA-Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.

ASADULLAH, Kh; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 241-269, 2003.

ASADULLAH, Kh; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 241-269, 2003.

ASSEMAN, Chrystelle et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 7, p. 995-1004, 1999.

BARBOZA, Kelly Ribeiro Moura et al. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. **Life Sciences**, v. 209, p. 370-376, 2018.

BARICHELLO, Tatiana et al. Sodium butyrate prevents memory impairment by re-establishing BDNF and GDNF expression in experimental pneumococcal meningitis. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 734-740, 2015.

BENGOA, Ana A. et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. **Food microbiology**, v. 69, p. 212-218, 2018.

BERG, D. J. et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4⁺ Th1-like responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 4, p. 1010–1020, 15 ago. 1996.

BHATTACHARJEE, Surjyadipta; LUKIW, Walter J. Alzheimer's disease and the microbiome. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 153, 2013.

BLOCK, Michelle L.; ZECCA, Luigi; HONG, Jau-Shyong. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.

BOLLINGER, Justin L. et al. Behavioral stress alters corticolimbic microglia in a sex- and brain region-specific manner. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0187631, 2017.

BRANISTE, Viorica et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Science translational medicine**, v. 6, n. 263, p. 263ra158-263ra158, 2014.

BRAVO, Javier A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 16050-16055, 2011.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1978. p. 302-310.

CANTU-JUNGLES, Thaisa M.; RASMUSSEN, Heather E.; HAMAKER, Bruce R. Potential of prebiotic butyrogenic fibers in Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology**, p. 663, 2019.

CAPUCO, Alexander et al. Gut microbiome dysbiosis and depression: A comprehensive review. **Current pain and headache reports**, v. 24, n. 7, p. 1-14, 2020.

CHAMBERS, E. S. Gut-derived short-chain fatty acids: A friend or foe for hepatic lipid metabolism?. **Nutrition Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 154-159, 2019.

CHEN, Hsiao-Ling et al. Kefir peptides alleviate particulate matter $< 4 \mu\text{m}$ (PM_{4.0})-induced pulmonary inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway using luciferase transgenic mice. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

CHEN, Hsiao-Ling H. L. et al. Kefir peptides exhibit antidepressant-like activity in mice through the BDNF/TrkB pathway. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6415–6430, 1 jun. 2021.

CHEN, Hsi-Chia; WANG, Sheng-Yao; CHEN, Ming-Ju. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food microbiology**, v. 25, n. 3, p. 492-501, 2008.

CHEN, Weizhe et al. Kefir microbiota and metabolites stimulate intestinal mucosal immunity and its early development. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-14, 2022.

DA SILVA, P. F. et al. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. **Neuroscience**, v. 200, p. 42-49, 2012.

DALILE, Boushra et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461-478, 2019.

DANEMAN, Richard; PRAT, Alexandre. The blood–brain barrier. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 2015.

DE PALMA, Giada et al. The microbiota–gut–brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both?. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 14, p. 2989-2997, 2014.

DE VADDER, Filipe et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 84-96, 2014.

DESBONNET, Lieve et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1179-1188, 2010.

DIETERICH, Sabine et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Brain-gut-microbiota axis and mental health. **Psychosomatic medicine**, v. 79, n. 8, p. 920-926, 2017.

DOGI, C. et al. *Lactobacillus rhamnosus* RC007 intended for feed additive: immunostimulatory properties and ameliorating effects on TNBS-induced colitis. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 4, p. 539–547, 1 set. 2016.

DOMINGUEZ-BELLO, Maria Gloria et al. Role of the microbiome in human development. **Gut**, v. 68, n. 6, p. 1108-1114, 2019.

DORON, Itai et al. Mycobiota-induced IgA antibodies regulate fungal commensalism in the gut and are dysregulated in Crohn's disease. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1493-1504, 2021.

DUSCHA, Alexander et al. Propionic acid shapes the multiple sclerosis disease course by an immunomodulatory mechanism. **Cell**, v. 180, n. 6, p. 1067-1080. e16, 2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Disponível em <<https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>> [Consultado em 12/01/2022].

FRÖHLICH, Esther E. et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication. **Brain, behavior, and immunity**, v. 56, p. 140-155, 2016.

FROST, Gary et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2014.

GANAPATHY, Vadivel et al. Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. **Current opinion in pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 869-874, 2013.

GAO, Kan et al. Increasing carbohydrate availability in the hindgut promotes hypothalamic neurotransmitter synthesis: aromatic amino acids linking the microbiota–brain axis. **Journal of Neurochemistry**, v. 149, n. 5, p. 641-659, 2019.

GAROFALO, Cristiana et al. Study of kefir drinks produced by backslopping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: Microbial dynamics and volatilome profile. **Food Research International**, v. 137, p. 109369, 2020.

GONZALEZ, Emmanuel et al. Trees, fungi and bacteria: tripartite metatranscriptomics of a root microbiome responding to soil contamination. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-30, 2018.

GRENHAM, Sue et al. Brain–gut–microbe communication in health and disease. **Frontiers in physiology**, v. 2, p. 94, 2011.

GUVEN, Mustafa et al. The neuroprotective effect of kefir on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 57, n. 5, p. 335-341, 2015.

HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HOOGLAND, Inge et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2015.

HOYLES, Lesley et al. Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2018.

HSIAO, Elaine Y. et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1451-1463, 2013.

HYEON, J. K. et al. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: Multiple mechanisms of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 3, p. 892–901, jun. 2007.

IEBBA, Valerio et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 1-12, 2016. IEBBA, V. et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota SuMMARy. *New Microbiologica*. [S.l: s.n.], 2016a.

IP, WK Eddie et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.

ISMAIEL, Ahmed A.; GHALY, Mohamed F.; EL-NAGGAR, Ayman K. Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1602-1609, 2011.

KELLY, John R. et al. Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of psychiatric research**, v. 82, p. 109-118, 2016.

KIM, Dong-Hyeon et al. Rapid detection of *Lactobacillus kefirianofaciens* in kefir grain and kefir milk using newly developed real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 855-858, 2015.

KLEINWIETFIELD, Markus; HAFLER, David A. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. **Immunological reviews**, v. 259, n. 1, p. 231-244, 2014.

KOWALSKI, Karol; MULAK, Agata. Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 25, n. 1, p. 48, 2019.

LARABI, Anaïs; BARNICH, Nicolas; NGUYEN, Hang Thi Thu. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 38-51, 2020.

LEWIS, Kimberley et al. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 7, p. 1138-1148, 2010.

LI, Haixiao et al. Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. **Brain research**, v. 1642, p. 70-78, 2016.

LI, Zhuang et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. **Gut**, v. 67, n. 7, p. 1269-1279, 2018.

LIU, Bo; TONKONOGY, Susan L.; SARTOR, R. Balfour. Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 653-662. e4, 2011.

LIU, Hu et al. Butyrate: a double-edged sword for health?. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 21-29, 2018.

LOWRY, Oliver H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYMAN, Monty et al. Neuroinflammation: the role and consequences. **Neuroscience research**, v. 79, p. 1-12, 2014. LYMAN, M. et al.

MACFARLANE, Sandra; MACFARLANE, George T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 67-72, 2003.

MAGALHÃES, Karina Teixeira et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MARKOWIAK-KOPEĆ, Paulina; ŚLIŻEWSKA, Katarzyna. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1107, 2020.

MATT, Stephanie M. et al. Butyrate and dietary soluble fiber improve neuroinflammation associated with aging in mice. **Frontiers in immunology**, p. 1832, 2018.

MCCLOUGHLIN, Rebecca F. et al. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, n. 3, p. 930-945, 2017.

MEDRANO, Micaela et al. Kefiran fermentation by human faecal microbiota: Organic acids production and in vitro biological activity. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, p. 100229, 2020.

MENDES, Tiago Antônio de Oliveira et al. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2524, 2013.

MISHIMA, Yoshiyuki et al. Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10–producing regulatory B cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 9, p. 3702-3716, 2019.

MOLINA-TORRES, Guadalupe et al. Stress and the gut microbiota-brain axis. **Behavioural pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 187-200, 2019.

MORAIS, Livia H.; SCHREIBER, Henry L.; MAZMANIAN, Sarkis K. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 241-255, 2021.

MÖRKL, Sabrina et al. Probiotics and the microbiota-gut-brain axis: focus on psychiatry. *Current nutrition reports*, v. 9, n. 3, p. 171-182, 2020.

NOORI, Negin et al. Kefir protective effects against nicotine cessation-induced anxiety and cognition impairments in rats. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, 2014.

O'MAHONY, Siobhain M. et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioural brain research**, v. 277, p. 32-48, 2015.

PARKER, Aimée; FONSECA, Sonia; CARDING, Simon R. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. **Gut Microbes**, v. 11, n. 2, p. 135-157, 2020.

PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia et al. Kefir and intestinal microbiota modulation: implications in human health. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 638740, 2021.

PEREIRA, Thiago et al. The emerging scenario of the gut–brain axis: the therapeutic actions of the new actor kefir against neurodegenerative diseases. **Antioxidants**, v. 10, n. 11, p. 1845, 2021.

PRADO, Maria R. et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1177, 2015. PRADO, M. R. et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 30 out. 2015.

RAISON, Charles L.; CAPURON, Lucile; MILLER, Andrew H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in immunology**, v. 27, n. 1, p. 24-31, 2006.

REIGSTAD, Christopher S. et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 4, p. 1395-1403, 2015.

RODRIGUES, Hosana G. et al. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 50-58, 2016.

SABAT, Robert et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

SAMPSON, Timothy R. et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1469-1480. e12, 2016.

SARKAR, Amar et al. Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals. **Trends in neurosciences**, v. 39, n. 11, p. 763-781, 2016.

SCHÖNFELD, Peter; WOJTCZAK, Lech. Short-and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 6, p. 943-954, 2016.

SELLON, Rance K. et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5224-5231, 1998.

SEO, M. K. et al. Therapeutic effects of kefir grain Lactobacillus-derived extracellular vesicles in mice with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced inflammatory bowel disease. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 8662-8671, 2018.

SHEN, Yue et al. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 4, p. 509-520, 2012.

SHUKLA, Surabhi; TEKWANI, Babu L. Histone deacetylases inhibitors in neurodegenerative diseases, neuroprotection and neuronal differentiation. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 537, 2020.

SILVA, Ygor Parladore; BERNARDI, Andressa; FROZZA, Rudimar Luiz. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 25, 2020.

SUN, Ye. et al. Supplementation with Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 925–937, 1 fev. 2019.

SUN, Ye. et al. Supplementation with Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 925–937, 1 fev. 2019b.

SUZUKI, Takuya. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13357, 2020.

TALIB, Noorshafadzilah et al. Isolation and characterization of Lactobacillus spp. from kefir samples in Malaysia. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2606, 2019.

TON, A. M. M. et al. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, 2020a.

TON, A. M. M. et al. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, 2020b.

TSE, Joyce KY. Gut microbiota, nitric oxide, and microglia as prerequisites for neurodegenerative disorders. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 1438-1447, 2017.

VAN BODEGOM, Miranda; HOMBERG, Judith R.; HENCKENS, Marloes JAG. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 87, 2017.

VAN DE WOUW, Marcel et al . Distinct actions of the fermented beverage kefir on host behaviour, immunity and microbiome gut-brain modules in the mouse. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 18 dez. 2020b.

VAN DE WOUW, Marcel et al. Distinct actions of the fermented beverage kefir on host behaviour, immunity and microbiome gut-brain modules in the mouse. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 18 maio 2020a.

VAN DE WOUW, Marcel et al. Kefir ameliorates specific microbiota-gut-brain axis impairments in a mouse model relevant to autism spectrum disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 97, p. 119-134, 2021.

VAN DE WOUW, Marcel et al. Microbiota-gut-brain axis: modulator of host metabolism and appetite. **The Journal of nutrition**, v. 147, n. 5, p. 727-745, 2017.

VAN DER BEEK, Christina M. et al. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. **Nutrition reviews**, v. 75, n. 4, p. 286-305, 2017.

VARATHARAJ, Aravinthan; GALEA, Ian. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 60, p. 1-12, 2017.

VINDEROLA, C. G. et al. Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response. **European Journal of Inflammation**, v. 3, n. 2, p. 63-73, 2005.

WANG, Hong-Xing; WANG, Yu-Ping. Gut microbiota-brain axis. **Chinese medical journal**, v. 129, n. 19, p. 2373-2380, 2016.

WANG, Yanbo et al. Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota, IL-10, and barrier function. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 335-349, 2020.

WU, Cong et al. Transient activation of mucosal effector immune responses by resident intestinal bacteria in normal hosts is regulated by interleukin-10 signalling. **Immunology**, v. 148, n. 3, p. 304-314, 2016.

XIONG, Ruo-Gu et al. Health benefits and side effects of short-chain fatty acids. **Foods**, v. 11, n. 18, p. 2863, 2022.

YEN, D. et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1310–1316, 1 maio 2006.

ZENG, Xuejun et al. Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic Tibetan kefir grains. **Food Research International**, v. 151, p. 110849, 2022.

ZENGELER, Kristine E.; LUKENS, John R. Innate immunity at the crossroads of healthy brain maturation and neurodevelopmental disorders. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 7, p. 454-468, 2021.

ZHENG, Hong et al. Depletion of acetate-producing bacteria from the gut microbiota facilitates cognitive impairment through the gut-brain neural mechanism in diabetic mice. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2021.

ZURITA-TURK, Meritxell et al. Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. **BMC biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

7. RESULTADOS

7.1 Artigo 1 (Revisão)- Beneficial effects of butyrate on brain functions: a view of epigenetic

Publicado no periódico Critical Reviews in Food Science and Nutrition (Fator de impacto:11.208)

7.2 Artigo 2 (Original)- Neuroprotective and intestinal effects of kefir consumption and the role of IL-10 in brain mice with intestinal inflammation

Beneficial effects of butyrate on brain functions: a view of epigenetic

Gabriela de Cássia Ávila Alpino ^{1*}, Gabriela Amorim Pereira-Sol², Mariana de Moura e Dias¹, Aline Silva de Aguiar³, Maria do Carmo Gouveia Peluzio¹

¹ *Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Brasil*

² *Departamento de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brasil*

³ *Departamento de Nutrição e Dietética, Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Brasil*

***Corresponding author:**

Gabriela de Cássia Ávila Alpino

Departamento de Nutrição e Saúde.

Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Av. P.H. Rolfs, s/n. 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

+55 24 988349174

Email address: gabialpino@hotmail.com

Beneficial effects of butyrate on brain functions: a view of epigenetics

Abstract

Brain functions are influenced by the presence, activity, and metabolism of the gut microbiota through the gut-microbiota-brain (GMB) axis. The consumption of a fiber-rich diet increases the content of short-chain fatty acids (SCFAs) from bacterial fermentation in the colon. Among SCFAs, butyrate stands out because of its wide array of biological functions, such as ability to influence brain functions. Pharmacologically, sodium butyrate (NaB) regulates gene expression in the brain, where it has several beneficial effects ranging from neurodegenerative diseases to behavioral disorders through inhibitors of histone deacetylases (HDACis). In this context, we review the mechanisms of action of the two types of butyrate on brain functions, with an emphasis on the epigenetic approach. Both types of butyrate are potentially interesting for the prevention and adjuvant therapy of neurological and psychological disorders due to their neuroprotective functions. However, further studies are needed to investigate the possible neuroepigenetic effects of butyrate derived from bacterial fermentation.

Keywords: Butyrate; gut-microbiota-brain axis; high-fiber diet; epigenetics; brain disorders.

Introduction

The gut-microbiota-brain (GMB) axis constitutes a bidirectional communication system between the gastrointestinal tract (GIT) and the central nervous system (CNS). This axis composes the CNS plus the enteric nervous, autonomic nervous (vagus nerve), neuroendocrine, and neuroimmune systems as well as the gut microbiota (Grenham et al. 2011).

The imbalance of gut microbiota can affect brain functions and it is associated with neurological diseases such as Autism Spectrum Disorder, Parkinson's, Alzheimer's Disease, and Depression (Fattorusso et al. 2019; Sun and Shen 2018; Liu et al. 2020; Capuco et al. 2020). Although the exact routes of the GMB axis have not been fully elucidated, changes in gut microbiota increase intestinal permeability, inflammatory cytokines, translocation of antigens, and reduce useful metabolites for brain health such as neurotransmitters and short-chain fatty acids (SCFAs), which contribute to neuroinflammation (Sun and Shen 2018).

Therefore, studies on microbiota modulation using probiotics (Steenbergen et al. 2015), prebiotics (Schmidt et al. 2015), a dietary fiber-rich diet (Cantu-Jungles, Rasmussen, and Hamaker 2019), and SCFAs supplementation in animals (sodium butyrate) have demonstrated control over inflammation, neuroprotection, and improvement of behavioral symptoms (Kratsman, Getselter, and Elliott 2016).

Butyrate produced by bacterial fermentation in the colon exerts indirect beneficial effects on the brain by improving the integrity of the intestinal barrier (Cantu-Jungles, Rasmussen, and Hamaker 2019), regulating immune responses, and stimulating the production and peripheral release of glucagon-like peptide (GLP-1) and peptide YY (PYY) via G protein-coupled receptor (GPCRs) in enteroendocrine cells (CEE) (Cantu-Jungles, Rasmussen, and Hamaker 2019; D'Souza et al. 2017). In addition, butyrate can cross the blood-brain barrier (BBB) and probably acts as a histone deacetylases inhibitor (HDACi). In the gut, butyrate can modulate the intestinal function of macrophages and attenuate the production of pro-inflammatory cytokines (NO, IL-6, IL-2) in response to lipopolysaccharide LPS through the HDACi, contributing to systemic defense, including brain defense (Chang et al. 2014) (Figure 1).

On the other hand, sodium butyrate (NaB), the sodium salt form of butyrate, is mostly used in pharmacological studies and has been shown to prevent neuronal cell death, to improve neurological immunity and behavioral and cognitive patterns,

besides improving learning and memory in mouse models of neurodegenerative disease via the epigenetic mechanism histone deacetylase inhibition HDACi (Kratsman, Getselter, and Elliott 2016; Bourassa et al. 2016). The current review summarizes the mechanisms of action of the microbial metabolite butyrate and NaB on brain functions with special attention to epigenetic mechanisms.

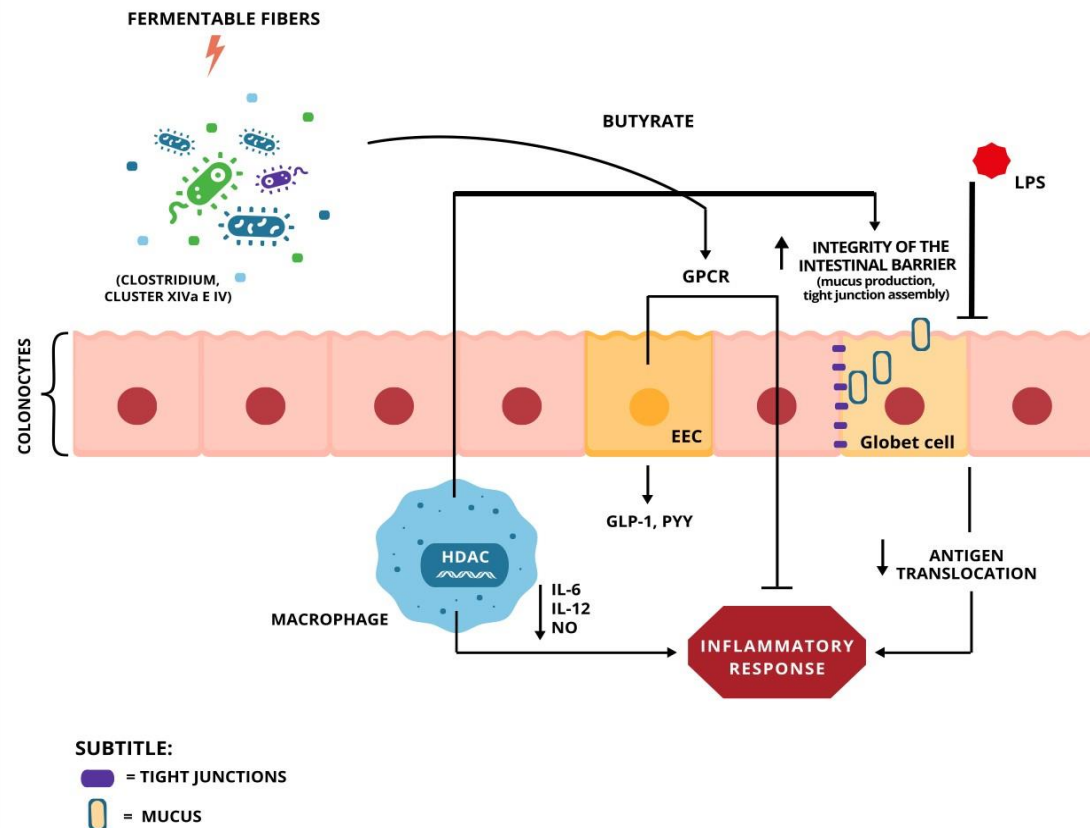


Figure 1: Local action of butyrate produced from bacterial fermentation in the colon. Butyrate produced from microbial fermentation enhances intestinal barrier function by stimulating mucus and tight junction, minimizing antigen translocation such as LPS and therefore inflammation. Butyrate also regulates inflammation through G protein-coupled receptors on enterocytes and by inhibiting histone deacetylases (HDACs) in intestinal macrophages. GPCR signaling in enteroendocrine cells (EECs) induces the secretion of the hormones glucagon-like peptide (GLP-1) and peptide YY (PYY) that have systemic action, including in the brain. GPCR, G protein-coupled receptor; CEE, enteroendocrine cells; GLP-1, glucagon-like peptide; PYY, peptide YY; HDAC, histone deacetylases; IL-6, interleukin 6; IL-12, interleukin 12; NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide.

The Role of SCFAs: Focus on Butyrate

SCFAs are saturated fatty acids that contain less than a range of six carbon atoms and are mainly produced from the fermentation of dietary fibers by bacteria in the gut. Additionally, SCFAs can also be generated from protein metabolism. Among them, acetate (C2), propionate (C3), and butyrate (C4) are found in major abundance in the colon at a molar ratio of approximately 60:25:15, respectively (Canani et al. 2011).

More than 90% of SCFAs are taken up by colonocytes mainly via H⁺-dependent monocarboxylate transporters (MCTs) or sodium-dependent monocarboxylate transporters (SMCTs) and used as energy for these cells, especially butyrate (Schönfeld and Wojtczak 2016; Silva et al. 2020). Therefore, only a small amount of butyrate reaches the hepatic system through the portal vein and other SCFAs that have not been used by colonocytes could be metabolized in the liver (Chambers, 2019).

In a smaller fraction, SCFAs reach the bloodstream and peripheral tissues (36% acetate, 9% propionate, and 2% butyrate) (Boets et al. 2015). Moreover, a minor portion of SCFAs in the rectum could bypass the liver and reach directly the systemic circulation via the internal iliac vein (van der Beek and McLoughlin, 2017). SCFAs activate cells through G protein-coupled receptors (GPCRs) such as GPR41 and GPR43, which have been renamed the free fatty acid receptor FFRA3 and FFRA2, respectively (King, Hittinger and Carroll 2003). Preferably, butyrate binds to FFRA3, while acetate and propionate have more affinity to FFRA2 (Liu et al. 2018; Kimura et al. 2011). FFRA2 is more expressed in immune cells, while FFRA3 is in the colon, kidneys, sympathetic nervous system, and blood vessels (Liu et al. 2018). FFRA3 is highly expressed in the sympathetic nervous system, thus knockout FFRA3 mice show reduced sympathetic ganglion activity (Kimura et al. 2011). Another butyrate binder is GPR109A, whose signaling is involved in the inflammasome pathway in immune cells in the colon, resulting in T-cell differentiation and IL-10 production (Singh et al. 2014). Moreover, SCFAs have intracellular functions as regulators of histone acetylation and methylation (Bourassa et al. 2016).

The role of SCFAs has shown a variety of biological effects on the host, such as immunoregulatory, anti-inflammatory, anti-obesity, anti-diabetes, hepatoprotective, cardioprotective, and neuroprotective actions (Xiong et al. 2022).

Among SCFAs, butyrate stands out for its metabolic, anti-inflammatory, and antioxidant, immunomodulatory functions as well as anticancer and neuroprotective effects (Liu et al. 2018; Chen and Vitetta 2018; Stilling et al. 2016). Furthermore,

butyrate is the most potent SCFA in inhibiting HDAC activities. Many anticancer, anti-inflammatory, and immunoregulatory activities have been found to be mediated through HDAC inhibition, but the mechanisms of brain functions are not yet fully elucidated (Xiong et al. 2022). The main pathway for butyrate synthesis is the acetyl-CoA pathway that is fuelled by carbohydrates, especially non-digestible carbohydrates, such as resistant starch and soluble fiber. Glutarate, 4-aminobutyrate, lysine, histidine, cysteine, serine, and alanine are protein-fed pathways that lead to the formation of butyrate to a minor extent (Louis and Flint 2017; Vital et al. 2017).

From the fermentation of dietary fibers by gut microbiota, monosaccharides will enter the glycolysis pathway, obtaining pyruvate as a final product. Pyruvate will turn into acetyl-CoA and be reduced to butyryl-CoA capable of following two paths to generate butyrate (Figure 2). In the first pathway (A), butyryl-CoA is phosphorylated to form butyryl-phosphate and then to butyrate via the butyrate kinase (Louis and Flint 2017). In the second (B), the CoA is transferred to acetate by butyryl CoA: acetate CoA transferase, leading to the formation of butyrate and acetyl-CoA (Trachsel et al. 2016).

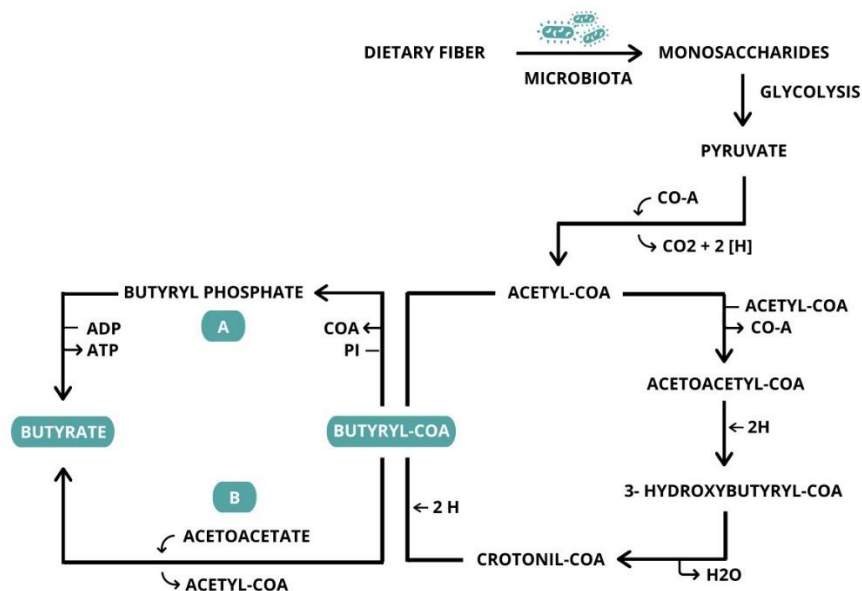


Figure 2: Microbial pathways of butyrate formation from carbohydrates

Redox reactions involving electron transport are represented by [H]. CO-A, Coenzyme-A; CO₂, Carbon Dioxide; H₂O, Water; H, Hydrogen; Pi, Inorganic Phosphate; ADP, Adenosine Diphosphate; ATP, Adenosine Triphosphate

A multitude of bacteria contribute to the butyrate pool in the human colon of healthy individuals. The efficient production of butyrate is influenced by the microbiota composition as a whole.

Vital et al. (2017) showed that most butyrate-producing families are *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* belonging to the phylum *Firmicutes*, whereas *Porphyromonadaceae* belonging to the phylum *Bacteroidetes* and other taxa were observed to a lesser extent. Regarding the species, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Oscillibacter*, *Clostridium XIVa*, and *Eubacterium rectale/Roseburia spp* were detected, forming a global core community of butyrate producers (Mokhtari, Gibson and Hekmatdoost 2017; Vital et al. 2017).

Faecalibacterium prausnitzii constitutes about one-fourth of all butyrate producers that exhibit the acetyl-CoA pathway and are preferred in the presence of riboflavin and reduced compounds such as cysteine and glutathione (Khan et al. 2012; Vital et al. 2017).

In addition, acetate and lactate produced during fermentation are relevant contributors to butyrate synthesis, hence a significant amount of the butyrate produced is not derived from fiber by particular species, but by cross-feeding interactions within the gut microbial ecosystem (Holscher 2017; Stilling et al. 2016).

Butyrate as an Endogenous Neuroendocrine Factor

Butyrate enhances the secretion of GLP-1 and PYY in the intestinal tract by GPCRs activation on enteroendocrine cells (Liu et al. 2018). However, FFAR3-deficient mice showed that FFAR3 plays a minor role in butyrate stimulation of GLP-1, suggesting an additional mechanism for butyrate-mediated stimulation of GLP-1 (Lin et al. 2012).

Serum GLP-1, PYY, and leptin regulate the short-term signal of satiety suppressing appetite via brain signaling. In addition, GLP-1 and PYY act at a local level through inhibiting gastric emptying and intestinal transit time and also stimulating insulin secretion, playing an important anti-obesity effect (Xiong et al. 2022; Knudsen et al. 2018; Liu et al. 2018).

In mice, GLP-1 binds to its brain receptors (GLP-1 R), exerting neurotrophic effects by increased BBB integrity and apoptosis (Liu et al. 2017). The brain action of GLP-1 is involved in learning, memory, and neuroplasticity improvement, reduction of

b-amyloid plaques, and activation of microglia in a model of Alzheimer's and Parkinson's Disease (Cantu-Jungles, Rasmussen, and Hamaker 2019; Liu et al. 2017).

Butyrate also affects satiety, food intake, and lipid oxidation, possibly by increasing triglyceride uptake via activating brown adipose tissue in mice. These results coincided with reduced orexigenic neuronal in the hypothalamus and neuronal activity in the solitary nucleus tract and dorsal vagal complex in the brainstem (Li et al. 2018).

It is possible that butyrate also plays in these effects via the vagus nerve. It is known that central endings of the vagus nerve innervate the brainstem, where signal transmission to the hypothalamus can occur, thus forming a circuit to regulate satiety (Schneeberger, Gomis, and Claret 2014). In addition, vagotomized animals had butyrate-induced satiety neutralized (Li et al. 2018).

Butyrate Inhibits Neuroinflammation via Gut Modulation

Butyrate can stimulate the expression of the mucin-2 (MUC2) gene, which is the main component of the mucus layer in the intestinal epithelium, enhancing protection against pathogens on the mucosal surface (Knudsen et al. 2018; Willemsen et al. 2003). Furthermore, butyrate modulates the expression of tight junctions (occludins, claudins, and zonulin), minimizing paracellular permeability and improving intestinal barrier integrity (Knudsen et al. 2018).

The mechanisms involved in these processes include the activation of AMP-K (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) protein and inhibition of HDACs (Stilling et al. 2016; Peng et al. 2009). These actions reinforce the role of butyrate in intestinal and systemic defense through the prevention of antigen translocation and chronic low-grade inflammation. Increased intestinal permeability and chronic low-grade inflammation are part of the phenotype of several neurodegenerative diseases (Sun and Shen 2018; Cantu-Jungles, Rasmussen, and Hamaker 2019). Thus, butyrate could prevent neuroinflammation due to improved intestinal and systemic defenses.

Human and animal studies have demonstrated the anti-inflammatory effect of butyrate by suppressing the pro-inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8, whereas IL-10 and TGF- β are up-regulated in response to butyrate (Liu et al. 2018; Elce et al. 2017; Chen et al. 2018). In addition, increasing evidence points

to butyrate as a regulator of activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ), a transcription factor antagonist of pro-inflammatory NF- κ B (Liu et al. 2018; Hamer et al. 2008; Alex et al. 2013). The regulation of PPAR- γ may be due to the inhibiting effect of histone deacetylases by butyrate. Moreover, butyrate interacts with immune cells and the vagus nerve via GPCRs (Silva, Bernardi, and Frozza 2020). These anti-inflammatory effects of butyrate can also indirectly contribute to the inhibition of neuroinflammation.

Butyrate and Brain Physiology

As previously mentioned, butyrate can cross the BBB and directly act on the brain (van de Wouw et al. 2017; Gagliano et al. 2014). Further to crossing BBB, butyrate and other SCFAs regulate its integrity, which is tightly associated with the controlled passage of molecules and nutrients from the circulation to the brain, playing a central role in CNS homeostasis (Braniste et al. 2014; Silva et al. 2020).

Germ-free mice feature increased BBB permeability compared to pathogen-free mice with normal gut microbiota. Colonization of *Clostridium tyrobutyricum*, a butyrate-producing or oral gavage administration of NaB restored BBB permeability in germ-free mice, indicating that butyrate plays a significant role in the integrity of the BBB. Concurrently, there was an increase in the acetylation of histones in the brain and in the expression of proteins that integrate a BBB (occludins and claudins) (Braniste et al. 2014). Therefore, butyrate is a molecule with the potential to interact directly with the CNS, thus the impact of a butyrate-producing fiber-rich diet on brain functions has been explored in recent years.

Sherry et al. (2010) demonstrated that the pectin-rich diet (10%) improved brain immunity and anti-inflammatory activity in mice-induced inflammation via LPS compared to the cellulose diet group. These results showed that consumption of soluble fiber (pectin) exerted neuroprotection and faster recovery to LPS compared to the insoluble fiber (cellulose) group. The authors associated the increase in butyrate from a pectin-rich diet with neuroimmune and anti-inflammatory outcomes.

Long-term consumption of fructooligosaccharide (FOS) and glucomannan (GM), non-digestible oligo and polysaccharides, improved cognitive decline and played a rejuvenating effect on SAMP8 mice, model of aging acceleration. *Bifidobacterium* levels were significantly higher in the FOS and GM groups, and there was an

improvement in the anti-inflammatory and antioxidant response of the FOS and GM groups compared to the AIN93 diet group (Nakamura et al. 2014). The authors suggest increasing the SCFAs in FOS and GM groups and their participation in cognitive and rejuvenating results.

Matt et al. (2018) investigated the effects of a diet rich in soluble fiber (inulin) on neuroinflammation in adult and aged mice over four weeks. A decrease in the expression of inflammatory genes in microglia as IL-1 β , IL-1 α , IL-6, Nlrp3, Tlr4, and TNF- α besides an increase in cecal acetate, butyrate, and total SCFAs to the control were identified. Moreover, we found alterations in epigenetic regulatory genes in response to a fiber-rich diet. The authors propose that the neuroprotective actions found by inulin are correlated with the increase in butyrate through a combination of its mechanisms.

A recent study demonstrated that a diet rich in fiber (fructans derived from agave tequilan) restores intestinal alteration in a mouse model of Alzheimer's. They observed an increase in butyrate-producing bacteria and fecal butyrate concentration in the fructans group compared to the standard diet and antibiotic groups (Cuervo-Zanatta et al. 2022). This condition resulted in improved working and spatial memory and reduced anxiety.

Sodium Butyrate in the Treatment of Brain Disorders: An Epigenetic View

Epigenetic modifications alter the chromatin structure and regulate the cell gene transcription, without changing the nucleotide sequence. The three most studied epigenetic mechanisms involved in the pathophysiology of several chronic diseases are histone acetylation, DNA methylation, and non-coding microRNAs. These modifications are dynamic and occur according to the activity of various enzymes, which can be influenced by a series of metabolites and environmental factors (Alenghat 2015).

Histone acetylation in the gene promoter region is generally associated with the activation of gene transcription. This process causes chromatin loosening by weakening the electrostatic bonds between histones, allowing transcriptional factors to easier access the DNA and promoting transcription (Bourassa et al., 2016). Acetyl groups are incorporated into histone lysine residues by histone acetyltransferases (HATs) enzymes and removed by histone deacetylases (HDACs). Reduced HAT

activity and, consequently, lower overall histone acetylation and transcriptional dysfunction are observed in many neurodegenerative diseases (Sleiman et al. 2009). Thereby, HDAC inhibitors have become potential therapeutic candidates for neurological conditions due to their histone acetylation function and alteration in gene transcription patterns.

NaB is a widely known and frequently used HDAC inhibitor in psychobiology (Matt et al. 2018; Shukla and Tekwani 2020; Ferrante et al. 2003). Intraperitoneal administration of NaB prolonged the survival of mice with Huntington's Disease (HD) R6/2 model, improving motor performance and gross brain weight and preventing striatal neuron atrophy and death (Ferrante et al. 2003). At the same time, there was an increase in brain acetylation of histones H3 and H4 in addition to the expression of α - and β -globulins and MAPK phosphatase 1 in the group treated with NaB, which was attributed to one of the mechanisms involved in the neuroprotective effects.

Matt et al. (2018) demonstrated that NaB decreased the expression of the IL-1 β gene in the microglia and hippocampus of adult and aged mice submitted to LPS, with a pronounced effect in the elderly group. Other studies with elderly animals show that the effects of butyrate are more responsive in this group (Blank et al. 2015; Walsh et al. 2015). It is believed that there are differences in chromatin changes in the brain between adult and elderly animals treated with HDACi (Castellano et al. 2012). Furthermore, the effects of butyrate may be more pronounced in the elderly due to its ability to neutralize age-related aspects of metabolic dysfunction (Matt et al., 2018).

NaB also promoted the activation of anti-inflammatory genes of IL 10-STAT3 signaling while suppressing the transcription of pro-inflammatory genes such as TNF- α , Stat1, Nos2, IL-6, and Irf1 in the microglia of ischemic model mice (Patnala et al. 2017). This neuroprotective effect was mediated by H3K9ac, indicating acetylation at the 9th lysine residue of histone 3 (Peterson and Laniel 2004). Generally, H3K9ac is associated with gene activation, but in this study it was also associated with the suppression of inflammatory genes in microglia, which allows considering the therapeutic behavior of this cell to NaB.

H3K9ac could increase the expression of phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) in the microglia of rodents treated with NaB (Saw et al. 2020). P13K is a family of enzymes involved in the induction and maintenance of long-term potentiation (LTP) in the hippocampus and synaptic plasticity (Horwood et al. 2006; Man et al. 2003). Saw et al. (2020) confirmed that P13K is epigenetically regulated and affects the expression

of BDNF levels, a key molecule involved in synaptic transmission and neuroplasticity (Saw et al. 2020).

In a Parkinson's Disease model, NaB attenuated motor deficits, increased dopamine levels in the cerebral striatum, attenuated oxidative stress, neuroinflammation and increased global acetylation of histone 3 and BDNF levels (Sharma, Taliyan, and Singh 2015). Similarly, NaB prevented apoptosis of dopaminergic cells (Kidd and Schneider 2010) and DNA damage (Paiva et al. 2017) *in vitro*.

NaB also improved learning and memory in models of brain infections and toxicity (Barichello et al. 2015; Silva et al. 2012). These benefits are associated with increased levels of neurotrophic factors such as BDNF and glial-derived neurotrophic factor (GDNF) in the rodent hippocampus, which are epigenetically modulated (Barichello et al. 2015; Intlekofer et al. 2013). Moreover, Alzheimer's models also answered by improving memory with NaB administration mediated by its epigenetic effect as an inhibitor of histone deacetylases (Govindarajan et al. 2011; Fernando et al. 2020).

There is still evidence that NaB acts on DNA methylation. In an animal model of depression, the antidepressant effect was associated with an increase in TET1 dioxygenase (DNA methylation stability enzyme) and BDNF in the NaB group (Wei et al. 2014). The authors believe that the increment in TET1 is associated with increased BDNF levels since it is regulated epigenetically.

As mentioned, BDNF is a brain neurotrophic factor that promotes neuroplasticity and neurogenesis. It is suppressed in several models of psychiatric disorders such as depression (Liu et al., 2017; Saw et al., 2020; Wei et al., 2014). Furthermore, BDNF is regulated by more than one type of epigenetic modification, noting that gene regulation depends on complex and dynamic molecular interactions.

Finally, NaB has been shown to attenuate social behavior deficits and improve neurobiology in animals with Autism Spectrum Disorder (ASD) (Kratsman, Getselter, and Elliott 2016; Takuma et al. 2014). ASD is possibly the mental disorder most correlated to the gut microbiota (Adams et al. 2011). Evidences from animals and humans suggest that perturbation of gut microbiota and its metabolites are part of the genesis and development of ASD (Adams et al. 2011; Srikantha and Mohajeri 2019; Fattorusso et al. 2019).

Alteration of gut microbiota is related to the temperament of autistic children,

decreased nutrient absorption, and increased intestinal permeability in the host. The prevalence of *Firmicutes* such as the genus *Clostridium* and a decline of *Bifidobacteria* among autistics is observed, which appears to be independent of diet (Srikantha and Mohajeri 2019; Fattorusso et al. 2019). At the cellular level, ASD is characterized by reduced neuroinhibitory signaling (e.g., GABAergic) (Braat and Kooy 2015).

Kratsman et al. (2015) demonstrated that NaB improves inhibitory signaling by decreasing the expression of excitatory genes and inducing the expression of inhibitory genes in the frontal cortex of autistic mice. These results were found even at low doses of NaB (100 mg/kg) that are not able to induce quantifiable differences in frontal cortex histone acetylation, but still attenuate social deficits of this model.

Dietary Fibers Modulates Gut Microbiota and Butyrate Production

According to the Codex Alimentarius, the definition of dietary fiber comprises carbohydrate polymers that are not hydrolyzed by the endogenous enzymes in the small intestine of humans and thus include resistant starch, arabinoxylan, beta-glucan, inulin, and others (Codex Alimentarius, 2010).

Some dietary fibers can also be classified as prebiotic. Prebiotics are defined as "a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit" (ISAAP 2016). The prebiotic effect of dietary fiber is associated with the growth of beneficial bacteria in the large intestine and the production of SCFAs and other beneficial metabolites to the host.

The large intestine has all conditions for bacterial growth: warm, moist, and anaerobic environment filled with feed residues that flow at a relatively low speed, denoting the essential site for butyrate production (Knudsen et al., 2018). The most important determinants of microbial degradation are the amounts and types of fibers that will enter the large intestine. For example, insoluble fibers, such as cellulose, found mainly in leafy vegetables, are naturally less fermentable when compared to soluble fibers, which are easily found in whole grains and fruits (Titgemeyer et al. 1991; Holscher 2017).

However, some insoluble fiber components are fermented by colonic bacteria due to the diversity of their genomic repertoire, which is higher than that of their host, capable of encoding complex carbohydrate catabolic enzymes (Flint et al. 2012; Knudsen et al. 2018). An *in vitro* study on a model of the human colon showed that a

fiber mix (20 mg) containing insoluble and soluble fractions of different dietary fibers increased butyrate production and had a bifidogenic effect (Tsitko et al. 2019).

The main substrates available for fermentation are non-starch polysaccharides, non-digestible oligosaccharides, sugar alcohols, and different forms of resistant starch such as polydextrose, galactooligosaccharide (GOS), fructooligosaccharides (FOS) and inulin (Bach et al. 2018). Fructans including inulin are easily found in vegetables for example agave, artichokes, asparagus, bananas, chicory root, garlic, onions, leeks, and wheat (Moshfegh et al. 1999).

Some substrates specifically stimulate butyrate production as arabinoxylan-type polysaccharides, present in cereal grains and bran as wheat, rye, and oats (Knudsen and Laerke 2010; Knudsen 2015). Studies with pigs have shown a relative increase in butyrate-producing *Faecalibacterium pausnitzii* and *Roseburia intestinalis* and the production of butyrate in the large intestine from a diet rich in arabinoxylan compared to the western diet and a diet rich in resistant starch, the latter producing more butyrate compared to the former (Ingerslev et al. 2014; Nilsen et al. 2014).

In vitro fermentation of resistant starch (RS) samples by fresh human fecal inoculum showed that RS5 (amylose–lipid complexes) increased butyric acid production compared to RS2 (nongelatinized native starch granule) and RS3 (retrograded starch) (Quin et al. 2021).

In an intervention with individuals presenting metabolic syndrome, the group that consumed a fiber-rich diet derived from whole grains, wheat bran, corn starch, and potato starch (64 g/kg) had significantly increased contents of acetate and butyrate in the stool compared to the group receiving a fiber-poor diet (17.6 g/kg) (Hald et al. 2016).

Diet rich in inulin increased 12% the total concentration of SCFA in the feces of healthy individuals, but potato starch obtained a superior result with 32%, including butyrate (Baxter et al. 2019). These results varied among the subjects because the fermentation rate is highly dependent on the genetics of the host, microbiological composition of the individual, adequacy of fiber in the diet, and dietary pattern.

An inulin-rich beverage (24g) increased butyrate and other SCFAs in the serum of healthy subjects after 4-6 hours of their consumption, and this was associated with increased colonic SCFA production, reduced postprandial free fatty acids and ghrelin concentrations (Tarini and Wolever 2010).

A randomized trial of healthy subjects investigated the impact of consuming

eight cereal-rich evening meals on plasma SCFA concentrations in the following morning. Evening meals composed of high amylose barley grains or high β -glucan barley grains resulted in higher plasma butyrate concentrations the next morning compared to an evening meal with white wheat bread (Nilsson et al. 2010).

A recent study on healthy adults evaluated the effects of a high-SCFA diet on plasma and fecal SCFA levels. The high-SCFA diet was a combination of dietary fermentable fibers (inulin and resistant starch) and oral SCFAs through apple cider vinegar fermented foods. The intervention diet increased total fecal SCFA levels and plasma butyrate, whereas total plasma SCFA levels were unchanged (Gill et al., 2022).

Conclusion

Sodium butyrate has better immunological and symptomatologic outcomes in the brain compared to butyrate from a high-fiber diet. That is probably due to the administration route and the supraphysiological NaB dose, whereas butyrate from a high-fiber diet is metabolized in colonocytes. However, both types are potentially interesting for the prevention and adjuvant therapy of neurological and behavioral disorders. The mechanisms of NaB are deeply related to epigenetics as an inhibitor of histone deacetylases, modifying transcriptional patterns of brain genes, which improves brain functions in neurological and behavioral animal models.

The mechanisms of butyrate from a high-fiber diet seem to be a combination of GPCR signaling and metabolic and epigenetic functions. Butyrate improves the intestinal barrier, hormone regulation, and activation of anti-inflammatory and immunomodulatory responses, which in turn influence brain functions through the vagus nerve, and humoral pathways by preventing systemic inflammation. Moreover, butyrate can cross the BBB and probably acts directly with the brain, but the neuro-epigenetic effect is still unknown.

Regular consumption of a high-fiber diet is a non-invasive and low-cost measure with the potential to prevent and alleviate brain disorders by increasing butyrate production. Further, more studies are needed to clarify the neuroepigenetic mechanisms of butyrate produced from a high-fiber diet.

Futures Perspectives

This work supports preclinical mechanistic studies on the neuroepigenetic effects of butyrate through a high-fiber diet. Future studies should evaluate dose responses of different types of dietary fiber on serum butyrate and estimate how much of this butyrate reaches the brain and have neuroepigenetic functions since there is a gap in the therapeutic levels and the neuroepigenetic mechanism of butyrate from a high-fiber diet. To increase the serum butyrate pool, it might be a good strategy to combine different dietary fibers, such as resistant starch and inulin, and butyrate-containing foods as fermented foods, including some dairy products and apple cider vinegar (Bourassa et al., 2016; Gill et al., 2022).

Regarding clinical trials, few studies measure circulating butyrate from dietary fiber fermentation. There is no estimate of how much of this butyrate reaches the human brain, which plays a gap between the nutritional recommendations to improve brain health via the direct route. Finally, more preclinical mechanistic studies and clinical trials are needed in different health models for a better understanding of the gaps around this knowledge, including possible side effects of butyrate.

Author Contributions

Literature survey and first draft writing were done by G.A., G.S, A.A., and the final draft including the revisions were accomplished by M.D. and M.C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Disclosure Statement

The authors have declared no conflicts of interest for this article.

Funding

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting scholarships to G.A and Luana Moraes for the art of the figures present in the article.

Orcid

Gabriela de Cássia Ávila Alpino <https://orcid.org/0000-0003-3102-7882>.

References

- Adams, J. B., L. J. Johasen, L. D. Powell, D. Quig, and R. A. Rubin. 2011. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology* 11 (1):22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22.
- Alenghat, T. Epigenomics and the microbiota. 2015. *Toxicologic Pathology* 43 (1):101-6. doi: 10.1177/0192623314553805.
- Alex, S., K. Lange, T. Amolo, J. S. Grinstead, A. K. Haakonsson, E. Szalowska, A. Koppen, K. Mudde, D. Haenen, S. Al-Lahham, et al. 2013. Short-chain fatty acids stimulate angiopoietin-like 4 synthesis in human colon adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Molecular and Cellular Biology* 33 (7):1303-16. doi: 10.1128/MCB.00858-12.
- Barichello, T., J. S. Generoso, L. R. Simões, C. J. Faller, R. A. Ceretta, F. Petronilho, J. Lopes-Borges, S. S. Valvassori, and J. Quevedo. 2015. Sodium Butyrate Prevents Memory Impairment by Re-establishing BDNF and GDNF Expression in Experimental Pneumococcal Meningitis. *Molecular Neurobiology* 52 (1):734-40. doi: 10.1007/s12035-014-8914-3.
- Baxter, N. T., A. W. Schmidt, A. Venkataraman, K. S. Kim, C. Waldron, and T. M. Schmidt. Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions with Three Fermentable Fibers. 2019. *mBio* 10 (1):e02566–18. doi:10.1128/mbio.02566-18.
- Blank, M., A. Werenicz, L. A. Velho, D. F. Pinto, A. C. Fedi, M. W. Lopes, T. V. Peres, R. B. Leal, A. S. Dornelles, and R. Roesler. 2015. Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats. *Neuroscience Letters* 594:76–81. doi:10.1016/j.neulet.2015.03.059.
- Boets, E., L. Deroover, E. Houben, K. Vermeulen, S. V. Gomand, J. A. Delcour, and K. Verbeke. Quantification of in Vivo Colonic Short Chain Fatty Acid Production from Inulin. 2015. *Nutrients* 7 (11):8916-29. doi: 10.3390/nu7115440.
- Bourassa, M. W., I. Alim, S. J. Bultman, and R. R. Ratan. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? 2016. *Neuroscience Letters* 625:56-63. doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.009.
- Braat, S., and R. F. Kooy. The GABA α Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. 2015. *Neuron Perspective* 86 (5):1119–1130.

doi:10.1016/j.neuron.2015.03.042.

Braniste, V., M. Al-Asmakh, C. Kowal, F. Anuar, A. Abbaspour, M. Tóth, A. Korecka, N. Bakocevic, L. Guan Ng, P. Gundu, et al. 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine* (6):263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759.

Canani, R., M. Costanzo, L. Leone, M. Pedata, R. Meli, A. Calignano. 2011. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology* 17 (12):1519-28. doi: 10.3748/wjg.v17.i12.1519.

Cantu-Jungles, T. M., H. E. Rasmussen, and B. R. Hamaker. Potential of Prebiotic Butyrogenic Fibers in Parkinson's Disease. 2019. *Frontiers in Neurology* (10):663. doi: 10.3389/fneur.2019.00663.

Capuco, A., I. Urits, J. Hasoon, R. Chun, B. Gerald, J.K. Wang, A. L. Ngo, T. Simopoulos, A.D. Kaye, M. M. Colantonio, T. Q. Parker-Actlis, M. C. Fuller, and O. Viswanath. Gut Microbiome Dysbiosis and Depression: a Comprehensive Review. 2020. *Current Pain and Headache Reports* 24 (7):36. doi: 10.1007/s11916-020-00871-x.

Castellano, J.F., B. R. Fletcher, B. Kelley-Bell, D. H. Kim, M. Gallagher, and P. R. Rapp. Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. 2012. *PLoS One* 9 (3):e33249. doi:10.1371/journal.pone.0033249.

Chambers, E. S. Gut-derived short-chain fatty acids: A friend or foe for hepatic lipid metabolism?. 2019. *Nutrition Bulletin* 44 (2)154-159. doi:10.1111/nbu.12377

Chang, P. V., L. Hao, S. Offermanns, R. Medzhitov. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6):2247–52. doi: 10.1073/pnas.1322269111.

Chen, G., X. Ran, B. Li, Y. Li, D. He, B. Huang, S. Fu, J. Liu, and W. Wang. Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. 2018. *EBioMedicine* (30):317-325. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.030.

Chen, J., and L. Vitetta. Inflammation-Modulating Effect of Butyrate in the Prevention of Colon Cancer by Dietary Fiber. 2018. *Clinical Colorectal Cancer* (3):e541-e544. doi: 10.1016/j.clcc.2018.05.001.

Codex Alimentarius. FAO, Rome: Joint FAO/WHO Food Standards Programme,

Secretariat of the Codex Alimentarius Commission; 2010. Guidelines on nutrition labelling CAC/GL 2-1985 as last amended 2010. Accessed October 14, 2022. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>.

Cuervo-Zanatta, D., T. Syeda, V. Sánchez-Valle, M. Irene-Fierro, P. Torres-Aguilar, M. A. Torres-Ramos, M. Shibayama-Salas, A. Silva-Olivares, L. G. Noriega, N. Torres, et al. Dietary Fiber Modulates the Release of Gut Bacterial Products Preventing Cognitive Decline in an Alzheimer's Mouse Model. 2022. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1-24. doi: 10.1007/s10571-022-01268-7.

D'Souza, W. N., J. Douangpanya, S. Mu, P. Jaeckel, M. Zhang, J. R. Maxwell, J. B. Rottman, K. Labitzke, A. Willee, H. Beckmann, et al. Differing roles for short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. 2017. *PLoS ONE* 12 (7):e0180190. doi: 10.1371/journal.pone.0180190

Elce, A., F. Amato, F. Zarrilli, A. Calignano, R. Troncone, G. Castaldo, and R. B. Canani. Butyrate modulating effects on pro-inflammatory pathways in human intestinal epithelial cells. 2017. *Beneficial Microbes* 8 (5):841-847. doi: 10.3920/BM2016.0197.

Fattorusso, A., L. Di Genova, G. B. Dell'Isola, E. Mencaroni, and S. Esposito. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. 2019. *Nutrients* 11 (3):521. doi: 10.3390/nu11030521.

Fernando, W. M. A. D. B., I. J. Martins, M. Morici, P. Bharadwaj, S. R. Rainey-Smith, W. L. F. Lim, and R. N. Martins. Sodium Butyrate Reduces Brain Amyloid- β Levels and Improves Cognitive Memory Performance in an Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model at an Early Disease Stage. 2020. *Journal of Alzheimer's Disease* 74 (1):91-99. doi: 10.3233/JAD-190120.

Ferrante, R. J., J. K. Kubilus, J. Lee, H. Ryu, A. Beesen, B. Zucker, K. Smith, N. W. Kowall, R. R. Ratan, R. Luthi-Carter, et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. 2003. *Journal of Neuroscience* 23 (28):9418-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-28-09418.2003.

Flint, H. J., K. P. Scott, S. H. Duncan, P. Louis, and E. Forano. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. 2012. *Gut Microbes* 3 (4):289-306. doi:10.4161/gmic.1989.

Gagliano, H., R. Delgado-Morales, A. Sanz-Garcia, and A. Armario. High doses of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate trigger a stress-like response.

2014. *Neuropharmacology* 79:75-82. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.10.031.

Gill, P. A., J. G. Muir, P. R. Gibson, and M. C. van Zelm. A Randomized Dietary Intervention to Increase Colonic and Peripheral Blood Short-Chain Fatty Acids Modulates the Blood B- and T-cell Compartments in Healthy Humans. 2022. *The American Journal of Clinical Nutrition* nqac246. doi: 10.1093/ajcn/nqac246.

Govindarajan, N., R. C. Agis-Balboa, J. Walter, F. Sananbenesi, and A. Fischer. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. 2011. *Journal of Alzheimer's Disease* 26 (1):187-197. doi:10.3233/JAD-2011-110080.

Grenham, S., G. Clarke, J. F. Cryan, and T. G. Dinan. Brain-gut-microbe communication in health and disease. 2011. *Frontiers in Physiology* 2:94. doi: 10.3389/fphys.2011.00094.

Hald, S., A. G. Schioldan, M. E. Moore, A. Dige, H. N. Lærke, J. Agnholt, K. E. B Knudsen, K. Hermansen, M. L. Marco, S. Gregersen, et al. Effects of Arabinoxylan and Resistant Starch on Intestinal Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Subjects with Metabolic Syndrome: A Randomised Crossover Study. 2016. *PLoS One* 11 (7):e0159223. doi: 10.1371/journal.pone.0159223.

Hamer, H. M., D. Jonkers, K. Venema, S. Vanhoutvin, F. J. Troost, and R. J. Brummer. Review article: the role of butyrate on colonic function. 2008. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27 (2):104-19. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.

Holscher, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. 2017. *Gut Microbes* 8 (2):172-184. doi: 10.1080/19490976.2017.1290756.

Horwood, J. M., F. Dufour, S. Laroche, and S. Davis. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3- kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. 2006. *European Journal of Neuroscience* 23 (12):3375-84. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04859.x.

Ingerslev, A. K., P. K. Theil, M. S. Hedemann, H. N. Lærke, and Knudsen K. E. B. Resistant starch and arabinoxylan augment SCFA absorption, but affect postprandial glucose and insulin responses differently. 2014. *The British Journal of Nutrition* 111 (9):1564-1576. doi: 10.1017/s0007114513004066.

Intlekofer, K. A., N. C. Berchtold, M. Malvaez, A. J. Carlos, S. C. McQuown, M. J. Cunningham, M. A. Wood, and C. W. Cotman. Exercise and sodium butyrate transform a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived

neurotrophic factor-dependent mechanism. 2013. *Neuropsychopharmacology* 38 (10):2027-34. doi: 10.1038/npp.2013.104.

ISAAP. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. Prebiotics, 2016. Accessed October 14, 2022. <https://isappscience.org/for-scientists/resources/prebiotics/>.

Khan, M. T., S. H. Duncan, A. J. Stams, J. M. van Dijk, H. J. Flint, and H. J. Harmsen. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. 2012. *The ISME journal* 6 (8):1578-85. doi: 10.1038/ismej.2012.5.

Kidd, S. K., and J. S. Schneider. Protection of dopaminergic cells from MPP⁺-mediated toxicity by histone deacetylase inhibition. 2010. *Brain research* 1354:172-178. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.041.

Kimura, I., D. Inoue, T. Maeda, T. Hara, A. Ichimura, S. Miyauchi, M. Kobayashi, A. Hirasawa, and G. Tsujimoto. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). 2011. *Proceedings of the national academy of sciences* 108 (19):8030-8035. doi: 10.1073/pnas.1016088108.

King, N., C. T. Hittinger, and S. B. Carroll. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. 2003. *Science* 301 (5631):361-363. doi: 10.1126/science.1083853.

Knudsen, K. E. B. Microbial degradation of whole-grain complex carbohydrates and impact on short-chain fatty acids and health. 2015. *Advances in Nutrition* 6 (2):206-13. doi: 10.3945/an.114.007450.

Knudsen, K. E. B., and H. N. Lærke. REVIEW: Rye Arabinoxylans: Molecular Structure, Physicochemical Properties and Physiological Effects in the Gastrointestinal Tract. 2010. *Cereal Chemistry Journal* 87 (4):353–362. doi:10.1094/cchem-87-4-0353.

Knudsen, K. E. B., H. N. Laerke, M. S. Hedemann, T. S. Nielsen, A. K. Ingerslev, D. S. G. Nielsen, P. K. Theil, S. Purup, S. Hald, A. G. Schioldan, et al. 2018. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients* 10 (10):1499. doi: 10.3390/nu10101499.

Kratsman, N., D. Getselter, and E. Elliott. Sodium butyrate attenuates social behavior deficits and modifies the transcription of inhibitory/excitatory genes in the

frontal cortex of an autism model. 2016. *Neuropharmacology* (102):136-45. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.11.003.

Li, Z., C. X. Yi, S. Katiraei, S. Kooijman, E. Zhou, C. K. Chung, Y. Gao, J. K van den Heuvel, O. C. Meijer, J. F. P. Berbée, et al.. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. 2018. *Gut* 67 (7):1269-1279. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314050.

Lin H. V., A. Frassetto, E. J. Kowalik Jr, A. R. Nawrocki, M. M. Lu, J. R. Kosinski, J. A. Hubert, D. Szeto, X. Yao, G. Forrest, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. 2012. *PLoS One*. 2012;7 (4):e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.

Liu, H., J. Wang, T. He, S. Becker, G. Zhang, D. Li, and X. Ma. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health?. 2018. *Advances in Nutrition* 9 (1):21-29. doi: 10.1093/advances/nmx009.

Liu, J., F. Wang, S. Liu, J. Du, X. Hu, J. Xiong, R. Fang, W. Chen, and J. Sun. Sodium butyrate exerts protective effect against Parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon-like peptide-1. 2017. *Journal of the Neurological Sciences* 381:176-181. doi: 10.1016/j.jns.2017.08.3235.

Liu, S., J. Gao, M. Zhu, K. Liu, and H. L. Zhang. Gut Microbiota and Dysbiosis in Alzheimer's Disease: Implications for Pathogenesis and Treatment. 2020. *Molecular neurobiology* 57 (12):5026-5043. doi: 10.1007/s12035-020-02073-3.

Louis, P., and H. J. Flint. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. 2017. *Environmental Microbiology* 19 (1):29-41. doi: 10.1111/1462-2920.13589.

Man, H.Y, Q. Wang, W. Y. Lu, W. Ju, G. Ahmadian, L. Liu, S. D'Souza, T. P. Wong, C. Taghibiglou, J. Lu, et al. Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. 2003. *Neuron* 38 (4):611-624. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00228-9.

Matt, S. M., J. M. Allen, M. A. Lawson, L. J. Mailing, J. A. Woods, and R. W. Johnson. Butyrate and dietary soluble fiber improve neuroinflammation associated with aging in mice. 2018. *Frontiers in Immunology* 9:1832. doi: 10.3389/fimmu.2018.01832.

McLoughlin, R. F., B. S. Berthon, M. E. Jensen, K. J. Baines, and L. G. Wood. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. 2017. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106

(3):930-945. doi: 10.3945/ajcn.117.156265.

Mokhtari, Z., D. L. Gibson, and A. Hekmatdoost. Nonalcoholic fatty liver disease, the gut microbiome, and diet. 2017. *Advances in Nutrition* 8 (2):240-252. doi: 10.3945/an.116.013151.

Moshfegh, A. J., J. E. Friday, J. P. Goldman, and J. K. Ahuja. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. 1999. *The Journal of nutrition* 129 (7):1407S-1411S. doi: 10.1093/jn/129.7.1407S.

Nakamura, S., N. Kondo, Y. Yamaguchi, M. Hashiguchi, K. Tanabe, C. Ushiroda, M. Kawahashi-Tokuhisa, K. Yui, M. Miyakoda, et al. Daily feeding of fructooligosaccharide or glucomannan delays onset of senescence in SAMP8 mice. 2014. *Gastroenterology Research and Practice* 2014:303184. doi: 10.1155/2014/303184.

Nielsen, T. S., H. N. Lærke, P. K. Theil, J. F. Sørensen, M. Saarinen, S. Forssten, and K. E. Knudsen. Diets high in resistant starch and arabinoxylan modulate digestion processes and SCFA pool size in the large intestine and faecal microbial composition in pigs. 2014. *British journal of nutrition* 112 (11):1837-1849. doi: 10.1017/S000711451400302X.

Nilsson, A. C., E. M. Östman, K. E. Knudsen, J. J. Holst, and I. M. Björck. A cereal-based evening meal rich in indigestible carbohydrates increases plasma butyrate the next morning. 2010. *The Journal of nutrition* 140 (11):1932-1936. doi: 10.3945/jn.110.123604.

Paiva, I., R. Pinho, M. A. Pavlou, M. Hennion, P. Wales, A. L. Schütz, A. Rajput, É. M. Szego, C. Kerimoglu, E. Gerhardt, et al. Sodium butyrate rescues dopaminergic cells from alpha-synuclein-induced transcriptional deregulation and DNA damage. 2017. *Human molecular genetics* 26 (12):2231-2246. doi: 10.1093/hmg/ddx114.

Patnala, R., T. V. Arumugam, N. Gupta, and S. T. Dheen. HDAC inhibitor sodium butyrate-mediated epigenetic regulation enhances neuroprotective function of microglia during ischemic stroke. 2017. *Molecular Neurobiology* 54 (8):6391-6411. doi:10.1007/s12035-016-0149-z.

Peng, L., Z. R. Li, R. S. Green, I. R. Holzman, and J. Lin. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. 2009. *The Journal of nutrition* 139 (9):1619-1625. doi: 10.3945/jn.109.104638.

Peterson, C. L., and M. A. Laniel. Histones and histone modifications.

2004. *Current Biology* 14 (14):R546-R551. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.007.

Qin, R., J. Wang, C. Chao, J. Yu, L. Copeland, S. Wang, and S. Wang. RS5 Produced More Butyric Acid through Regulating the Microbial Community of Human Gut Microbiota. 2021. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (10):3209-3218. doi: 10.1021/acs.jafc.0c08187.

Saw, G., K. Krishna, N. Gupta, T. W. Soong, K. Mallilankaraman, S. Sajikumar, and S. T. Dheen. Epigenetic regulation of microglial phosphatidylinositol 3-kinase pathway involved in long-term potentiation and synaptic plasticity in rats. 2020. *Glia* 68 (3):656-669. doi:10.1002/glia.23748.

Schmidt, K., P. J. Cowen, C. J. Harmer, G. Tzortzis, S. Errington, and P. W. Burnet. Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. 2015. *Psychopharmacology* 232 (10):1793-1801. doi: 10.1007/s00213-014-3810-0.

Schneeberger, M., R. Gomis, and M. Claret. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. 2014. *Journal of endocrinology* 220 (2):T25-T46. doi: 10.1530/JOE-13-0398.

Schönfeld, P., and L. Wojtczak. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. 2016. *Journal of lipid research* 57 (6):943-954. doi: 10.1194/jlr.R067629.

Sharma, S., R. Taliyan, and S. Singh. Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities: Modulation of histone deacetylase activity. 2015. *Behavioural brain research* 291:306- 314. doi:10.1016/j.bbr.2015.05.052.

Sherry, C. L., S. S. Kim, R. N. Dilger, L. L. Bauer, M. L. Moon, R. I. Tapping, G. C. Fahey Jr, K. A. Tappenden, and G.C. Freund. Sickness behavior induced by endotoxin can be mitigated by the dietary soluble fiber, pectin, through up-regulation of IL-4 and Th2 polarization. 2010. *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (4):631-640. doi:10.1016/j.bbi.2010.01.015.

Shukla, S., and B. L. Tekwani. Histone deacetylases inhibitors in neurodegenerative diseases, neuroprotection and neuronal differentiation. 2020. *Frontiers in pharmacology* 11:537. doi:10.3389/fphar.2020.00537.

Silva, P. F., V. A. Garcia, A. S. Dornelles, V. K. Silva, N. Maurmann, B. C. D. Portal, R. D. P. Ferreira, F. C. Piazza, R. Roesler, and N. Schröder. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9

acetylation and ameliorated by sodium butyrate. 2012. *Neuroscience* 200:42-49. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.038.

Silva, Y. P., A. Bernardi, and R. L. Frozza. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. 2020. *Frontiers in endocrinology* 11:25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.

Singh, N., A. Gurav, S. Sivaprakasam, E. Brady, R. Padia, H. Shi, M. Thangaraju, P. D. Prasad, S. Manicassamy, D. H. Munn, et al.. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. 2014. *Immunity* 40 (1):128-39. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007.

Sleiman, S. F., M. Basso, L. Mahishi, A. P. Kozikowski, M. E. Donohoe, B. Langley, and R. R. Ratan. Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. 2009. *Expert opinion on investigational drugs* 18 (5):573-584. doi: 10.1517/13543780902810345.

Srikantha, P., and M. H. Mohajeri. The Possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. 2019. *International Journal of molecular sciences*. 20 (9):2115. doi: 10.3390/ijms20092115.

Steenbergen, L., R. Sellaro, S. van Hemert, J. A. Bosch, and L. S. Colzato. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. 2015. *Brain, Behavior, and Immunity* 48:258-264. doi: 10.1016/j.bbi.2015.04.003.

Stilling, R. M., M. van de Wouw, G. Clarke, C. Stanton, T. G. Dinan, and J. F. Cryan. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis?. 2016. *Neurochemistry international* 99:110-132. doi: 10.1016/j.neuint.2016.06.011.

Sun, M. F., and Y. Q. Shen. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease. 2018. *Ageing research reviews* 45:53-61. doi: 10.1016/j.arr.2018.04.004.

Takuma, K., Y. Hara, S. Kataoka, T. Kawanai, Y. Maeda, R. Watanabe, E. Takano, A. Hayata-Takano, H. Hashimoto, Y. Ago, et al. Chronic treatment with valproic acid or sodium butyrate attenuates novel object recognition deficits and hippocampal dendritic spine loss in a mouse model of autism. 2014. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 126:43-49. doi: 10.1016/j.pbb.2014.08.013.

Tarini, J., and T. M. Wolever. The fermentable fibre inulin increases postprandial

serum short-chain fatty acids and reduces free-fatty acids and ghrelin in healthy subjects. 2010. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 35 (1):9-16. doi: 10.1139/H09-119.

Titgemeyer, E. C., L. D. Bourquin, G. C. Fahey Jr, K. A. Garleb. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. 1991. *The American journal of clinical nutrition* 53 (6):1418-1424. doi: 10.1093/ajcn/53.6.1418. PMID: 1852091.

Trachsel, J., D. O. Bayles, T. Looft, U. Y. Levine, and H. K. Allen. Function and phylogeny of bacterial butyryl coenzyme a:acetate transferases and their diversity in the proximal colon of swine. 2016. *Applied and environmental microbiology* 82 (22):6788-6798. doi: 10.1128/AEM.02307-16.

Tsitko, I., F. Wiik-Miettinen, O. Mattila, N. Rosa-Sibako, T. Seppänen-Laakso, J. Maukonen, E. Nordlund, and M. Saarela. A small in vitro fermentation model for screening the gut microbiota effects of different fiber preparations. 2019. *International journal of molecular sciences* 20 (8):1925. doi:10.3390/ijms20081925.

van de Wouw, M., H. Schellekens, T. G. Dinan, and J. F. Cryan. Microbiota-gut-brain axis: modulator of host metabolism and appetite. 2017. *The Journal of Nutrition* 147 (5):727-745. doi: 10.3945/jn.116.240481.

van de Wouw, M., H. Schellekens, T. G. Dinan, and J. F. Cryan. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. 2017. *The Journal of Nutrition* 147 (5):727-745. doi: 10.3945/jn.116.240481.

van der Beek, C. M., C. H. C, Dejong, F. J. Troost, A. A. M. Masclee, and K. Lenaerts. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. 2017. *Nutrition Reviews* 75 (4):286-305. doi: 10.1093/nutrit/nuw067.

Vital, M., A. Karch, and D. H. Pieper. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. 2017. *mSystems* 2 (6):e00130-17. doi: 10.1128/mSystems.00130-17. Walsh, M. E., A. Bhattacharya, K. Sataranatarajan, R. Qaisar, L. Sloane, M. M. Rahman, M. Kinter, and H. Van Remmen. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. 2015. *Aging Cell* 14 (6):957–970. doi:10.1111/accel.12387.

Wei, Y., P. A. Melas, G. Wegener, A. A. Mathé, and C. Lavebratt. Antidepressant-like effect of sodium butyrate is associated with an increase in TET1 and in 5-hydroxymethylation levels in the Bdnf gene. 2014. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (2):pyu032. doi: 10.1093/ijnp/pyu032.

Willemsen, L. E., M. A. Koetsier, S. J. van Deventer, and E. A. van Tol. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. 2003. *Gut* 52 (10):1442-1447. doi: 10.1136/gut.52.10.1442.

Wolever, T. M., and J. L. Chiasson. Acarbose raises serum butyrate in human subjects with impaired glucose tolerance. 2000. *British Journal of Nutrition* 84 (1):57–61. doi: 10.1017/S0007114500001239.

Xiong, R-G., D-D. Zhou, S-X. Wu, S-Y. Huang, A. Saimaiti, Z-J. Yang, A. Shang, C-N. Zhao, R-Y. Gan, and H-B. Li. Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids. 2022. *Foods* 11 (18):2863. <https://doi.org/10.3390/foods11182863>.

Neuroprotective and intestinal effects of kefir consumption and the role of IL-10 in brain mice with intestinal inflammation

Gabriela de Cássia Ávila Alpino¹, Mariana Moura e Dias¹, Mariana de Fátima Albuquerque Pereira¹, Ananda Pereira Aguilár², Larissa Gabriela Morais de Ávila³, Pietra Riguette Reis¹, Katya Beatriz de Oliveira¹, Leandro Licursi de Oliveira⁴, Tiago Antônio de Oliveira Mendes², Maria do Carmo Gouveia Peluzio¹

Author affiliations:

¹ Department of Nutrition and Health. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

² Department of Biochemistry and Molecular Biology. Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

³ Interunit Postgraduate Program in Bioinformatics. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Avenida P. H. Rolfs, Campus Universitário S/N, Viçosa, Minas Gerais, CEP: 36570-900, Brazil

Abstract

Growing evidence shows that gut microbiota balance improves brain functions through the gut-brain axis. Intestinal inflammation supports the imbalance of gut microbiota, which increases inflammation, oxidative stress, and reduces beneficial metabolites for brain health. Recently, kefir has been considered a psychobiotic with the potential to prevent brain alterations due to anti-inflammatory, antioxidant, and gut modulation effects. Thus, we investigated whether kefir consumption could have neuroprotective action in a model of intestinal inflammation. C57BL/6 wild-type (n=10) and *knockout* IL-10 mice (IL-10^{-/-}) (n=10) were subdivided into groups that received 0.1 mL water or 0.1 mL (10% w/v) kefir. Brain tissues were homogenized to perform the analysis of cytokines, antioxidant activity, and short-chain fatty acids, and the small intestine was used for histological analysis. Kefir consumption improved morphometry in the small intestine of IL-10^{-/-} mice, in addition to exhibiting direct neuroprotective effects, increasing SCFAs and reducing malondialdehyde in the brain of IL-10^{-/-} mice. Although

the neuroprotective effects exerted by the consumption of kefir in IL-10^{-/-} mice, we found that the lack of IL-10 impaired the inflammatory response in the brain. Therefore, it is believed that the neuroprotective effects of kefir are improved by IL-10 in mice with intestinal inflammation.

Key words: kefir, psychobiotic, IL-10, knockout IL-10, brain, neuroprotection.

1. Introduction

The microbiota-gut-brain (MGB) axis comprises the bidirectional communication between the gastrointestinal tract (GT), the microorganisms that inhabit it, and the central nervous system (CNS). The gut microbiota is a key of this axis and reflects a diverse set of microorganisms that influences the brain-gut interactions at different times, from neural development to neurodegeneration, as at different levels from the intestinal lumen to the CNS (Dinan & Cryan, 2017).

There is growing evidence that disturbances in the gut microbiota impair the immune response of the intestinal mucosal, which is involved in neuroinflammation by enhancing systemic inflammation (Kowalski & Mulak, 2019).

Kefir is a natural fermented milk, probiotic, which can regulate the balance of gut microbiota, and enhance the host's immunomodulatory response through its probiotic microbiota and its own metabolites such as short chain fatty acids (SCFAs), exopolysaccharides (EPS), and microbial antigens (Chen et al., 2022).

The immunomodulatory functions of kefir include T cell regulation, increasing the number of Immunoglobulin A producers (IgA⁺), and the anti-inflammatory interleukin 10 (IL-10), improving the integrity of the intestinal epithelial barrier, inhibiting of Nf-kb signaling and raising the antioxidant enzymes (Chen et al., 2019; TON et al., 2020; Chen et al., 2022).

These mechanisms activated by kefir when combined can improve intestinal immunity, preventing systemic inflammation and neuroinflammation.

Indeed, kefir improves symptoms of neuroinflammatory diseases, and increase antioxidant and anti-inflammatory responses in Alzheimer's and stress induction models (Ton et al., 2020; Sun et al., 2019). Therefore, kefir can be considered a

potential psychobiotic due to a series of indirect mechanisms that reach the brain systemically or through the MGB axis.

It is noteworthy to mention that to our knowledge, there are no studies investigating the preventive effects of kefir on the brain in a model of intestinal inflammation, since it is a risk factor for neuroinflammation. Therefore, in order to investigate this knowledge gap, we used IL-10 deficient mice (IL-10^{-/-}) model, who have defects in immune regulation and develop a spontaneous gut inflammation. This inflammation is called enterocolitis upon colonization of the gut with particular microorganisms (Kühn et al., 1993; Zurita-Turk et al., 2020).

The role of IL-10 clearly oversteps the regulation of intestinal inflammation, since its function has been reported in several other sites, acting from infection to neurodegenerative diseases (Lobo-Silva et al., 2016; Wang et al., 2019).

In summary, the main role of IL-10 is to inhibit the occurrence of inflammation in the body due to its immunosuppressive activity and a central role involves the downregulation of inflammatory cascades (de Moreno de LeBlanc et al., 2011; Mocellin et al., 2004). IL-10 can also modulate IgA production, improve intestinal mucosal immunity, and upgrade IgA's class swap (Kandasamy et al. 2017).

Given the gut-microbiota-brain relationship, the probiotics, its immunomodulatory intestinal defense, the potential psychobiotic effects of kefir, and the role of IL-10 in the intestinal, brain, and systemic immune homeostasis, it is relevant to investigate the neuroprotective effect of this beverage in an IL10^{-/-} mice.

2. Material and Methods

2.1. *Kefir preparation*

The kefir grains used in the study were obtained from a household in the town of Viçosa, located in the Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brazil. The production of kefir was carried out at Nutritional Biochemistry Laboratory, Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa (UFV). Initially, the grains were activated and cultivated daily for a few weeks, and later separated into 20g portions and inoculated at a concentration of 10% with 200 mL ultra-high temperature (UHT) whole cow's milk (Cotochés, batch MG1 AM 5). The jars were kept at room temperature, 25°C

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, without agitation, in an aerobic environment. Subsequently, the grains were recovered by sieving, were washed with distilled water, and were inoculated into milk, repeating the steps described above for a new production of kefir. Subsequently, the milk kefir produced proceeded to maturation, under refrigeration at $7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, for 24 hours, and then, it was administered to the experimental mice. The microbiological count was controlled to guarantee a consistent probiotic level, and was offered 10^9 UFC in kefir treatment which is considered probiotic (MAPA, 2007).

2.2. *Experimental design*

2.2.1. *Animal and ethical aspect*

The animal experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA) of the Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil, under process number 35/2020. Male C57BL-6 mice wild type ($n=10$) and knockout IL-10 ($n=10$), 8 weeks old, weighing approximately 22g were obtained from the Central Animal House of the Health and Biological Sciences Center of the Universidade Federal de Viçosa (UFV). The animals were kept under a 12 h light/dark cycle at room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity (60-70%) with access to food and water ad libitum for 25 days, the total period of the experiment.

The mice were randomly divided into four experimental groups ($n= 5/\text{group}$): Water Wide Type (WWT) which received a commercial diet and orogastric gavage with filtered water (0.1mL), Kefir Wilde Type (KWT) that received a commercial diet and orogastric gavage with kefir (0.1mL,10% w/v), Water Knockout IL-10 (WKO), mice deficient in IL-10 (IL-10^{-/-}) that received commercial diet and orogastric gavage with filtered water (0.1mL) and Kefir Knockout IL-10 (KKO), IL-10^{-/-} mice that received a commercial diet and orogastric gavage with kefir (0.1mL,10% w/v) (Figure 1) The offered amount of kefir was 10^9 UFC considered probiotic (MAPA, 2007).

On day 26, all the animals were euthanized. Brain tissue was collected and flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent use. The small intestine was washed and fragmented into aliquots and stored in Carnoy's solution for histological analysis.

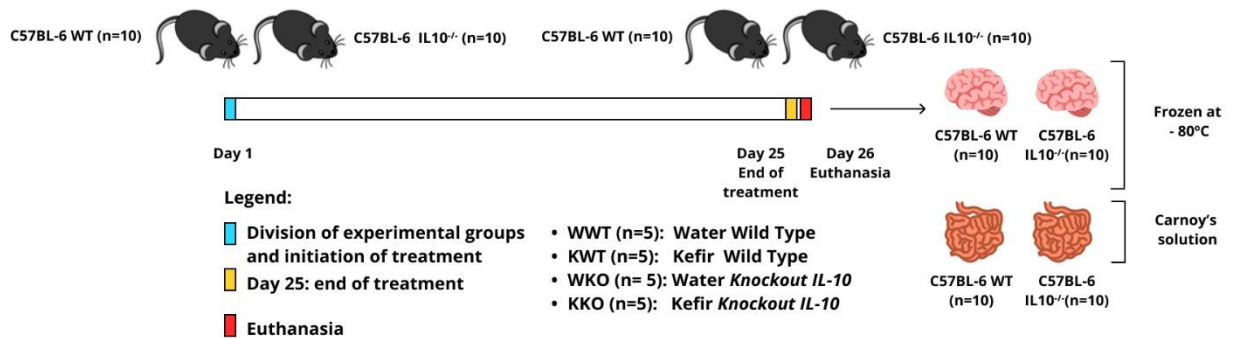


Fig 1 - Study Design

2.3. Histological Analysis on Small Intestine

After washing, fragments of the small intestine were fixed with Carnoy's solution, dehydrated, and embedded in paraffin. Serial sections were cut at 5 μm and placed on glass slides. Intestinal sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in a graded alcohol series, and stained with hematoxylin-eosin, and the images were obtained directly from the light microscope (Primo Star 2012, Zeiss®, Alemanha) to assess intestinal morphometry.

The morphometry variables: villus height, villus width, and depth of crypts were measured using the Image Pro Plus 4.5 software. The calibration of the program was performed before the measurements. Ten villi per animal were used for length and width measurements.

Villus height was measured only in villi with well-defined epithelium and visible connective tissue. The width was calculated by averaging the apical, medial, and basal regions. Ten circular crypts per animal were used for depth measurements. Villus surface area was calculated using the following equation.

$$\text{Villus surface area} = 2\pi \times \frac{vw}{2} \times VL$$

Where vw is the average of three measurements of villus width, and VL is the villus length (Agarwal et al., 2022).

2.4 Evaluation of Cytokines

Brain samples frozen at -80°C were homogenized in phosphate buffer pH 7 and centrifuged (12.000x g for 10 min, 4°C). The supernatant was used for evaluation of interleukin IL-2 (IL-2), interleukin IL-4 (IL-4), interleukin IL-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interferon gamma (IFN - γ), interleukin IL-10 (IL-10), and interleukin IL-17a (IL-17a). The analysis was done using the Cytometric Bead Array (CBA)(BD™) kit, according to the manufacturer's instructions and the reading was performed on flow cytometry FACSVerse. Cytokine levels determined by the assay in each sample (pg/mL) were normalized to their total loading protein concentration (pg/mg).

2.5 Determination of Short-Chain Fatty Acids

The extraction of SCFAs (acetic, propionic, and butyric) from the brain samples was carried out according to methodology described by Siegfried and collaborators with modifications (Siegfried et al., 1984).

Readings were performed on high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Shimadzu chromatograph (Shimadzu, Brazil, São Paulo). Ten microliters of sample were injected and passed through an HPX 87H column (Aminex®), 300cm x 7.8mm and pre-column of the same phase (Bio-Rad Laboratorios Brasil, Rio de Janeiro-RJ), with 5 mM H₂SO₄ as eluent at 0.6 mL/min, at 32 °C, and detected by a refractive index detector (RID-20A, Shimadzu).

2.6 Antioxidant Activity

Brain samples were homogenized in phosphate buffer (0.1M, pH 7) and centrifuged (12.000x g for 10 min, 4°C). The supernatant was used to evaluate the oxidation product malondialdehyde (MDA) according to the methodology described (Buege and Aust, 1978), and the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione S-transferase (GST). The activity of CAT was evaluated according to the method described by Hugo & Lester (Hugo and Lester, 1984) by measuring the rate of decomposition of hydrogen peroxide. The superoxide dismutase (SOD) activity was determined by the superoxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide reduction method, thereby decreasing the autooxidation of pyrogallol

(Dieterich et al., 2000). The glutathione S-transferase (GST) activity was measured using the method of Habig et al (Habig et al., 1974). Glutathione S-transferase activity was analyzed according to the formation of glutathione-conjugated 2,4-dinitrochlorobenzene (CDNB). Results were normalized by the total protein concentration of the supernatant samples (Lowry et al., 1951).

2.7 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

For the evaluation of the expression of zonulin-1 (ZO-1), occludin, and claudin-5 junction proteins in the brain, total RNA from the brain was extracted with Trizol reagent (Invitrogen®) following the manufacturer's instructions with modifications. RNA quality was evaluated by agarose gel and quantification was performed by Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen by Life technologies®), and subsequently treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega®). Approximately 1 µg of total RNA was used for cDNA synthesis according to the manufacturer's recommendations of a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®).

Quantitative PCR reactions were performed in duplicate and contained 1 µM forward and reverse primers, 5 µL of GoTaq qPCR Master Mix (Promega®), and 100 ng of cDNA at the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Conditions used for the amplification were 95 °C for 10 min, 40 cycles at denaturing 95 °C for 30 s, followed by annealing and extension at 60 °C for 1 min. After the 40 cycles, the temperature was gradually increased, by 1 °C increments, starting at 60 °C until reaching the limit of 95 °C, resulting in the generation of a melting curve.

The efficiency of amplification for each primer was determined by standard curve through a serial dilution of 1:2 of cDNA ranging from 50ng to 0.78 ng and calculated by the formula $\text{PCR efficiency} = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$. The standard curve was used to calculate the relative quantity values of each sample for each gene (Mendes et al., 2013). All data were normalized to GAPDH mRNA expression. All primers used are listed in Supplementary Table 1.

2.8 Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism software, version 8.3.0, compatible with Windows 10 (San Diego, California, USA). Data were expressed as mean \pm mean standard error. Statistical differences between samples and groups were analyzed using the ANOVA-One Way, in which (*) represents significant differences with $p < 0.05$, and (**) represents significant differences with $p < 0.001$.

3. Results

3.1 Histology of Small Intestine

The villi surface area, villus height, and crypt depth of the small intestine were significantly higher in the KKO group compared to the WKO group ($p < 0.05$) (Figure 2). (Table 1).

Table 1 - Effect of kefir consumption on the small intestine villus and crypt of wild type and IL10^{-/-} mice.

	Water WT	Kefir WT	Water KO	Kefir KO	P value
Villus					
Surface Area (μm^2)	64804 \pm 11196 ^{ab}	79742 \pm 815.6 ^{ab}	62249 \pm 9209 ^a	100117 \pm 11041 ^b	0.0308
Villus Height (μM)	298.6 \pm 37.88 ^{ab}	309.7 \pm 17.75 ^{ab}	259.5 \pm 16.30 ^a	383.6 \pm 25.13 ^b	0.0253
Villus Width (μM)	80.82 \pm 7.63	85.37 \pm 2.53	81.95 \pm 5.60	89.94 \pm 6.09	0.6851
Depth of Crypts (μM)	91.48 \pm 7.83 ^{ab}	86.36 \pm 6.89 ^{ab}	67.25 \pm 4.39 ^a	93.81 \pm 5.81 ^b	0.0311

Values are the means \pm SEM, n = 5. Different letters (a and b) indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

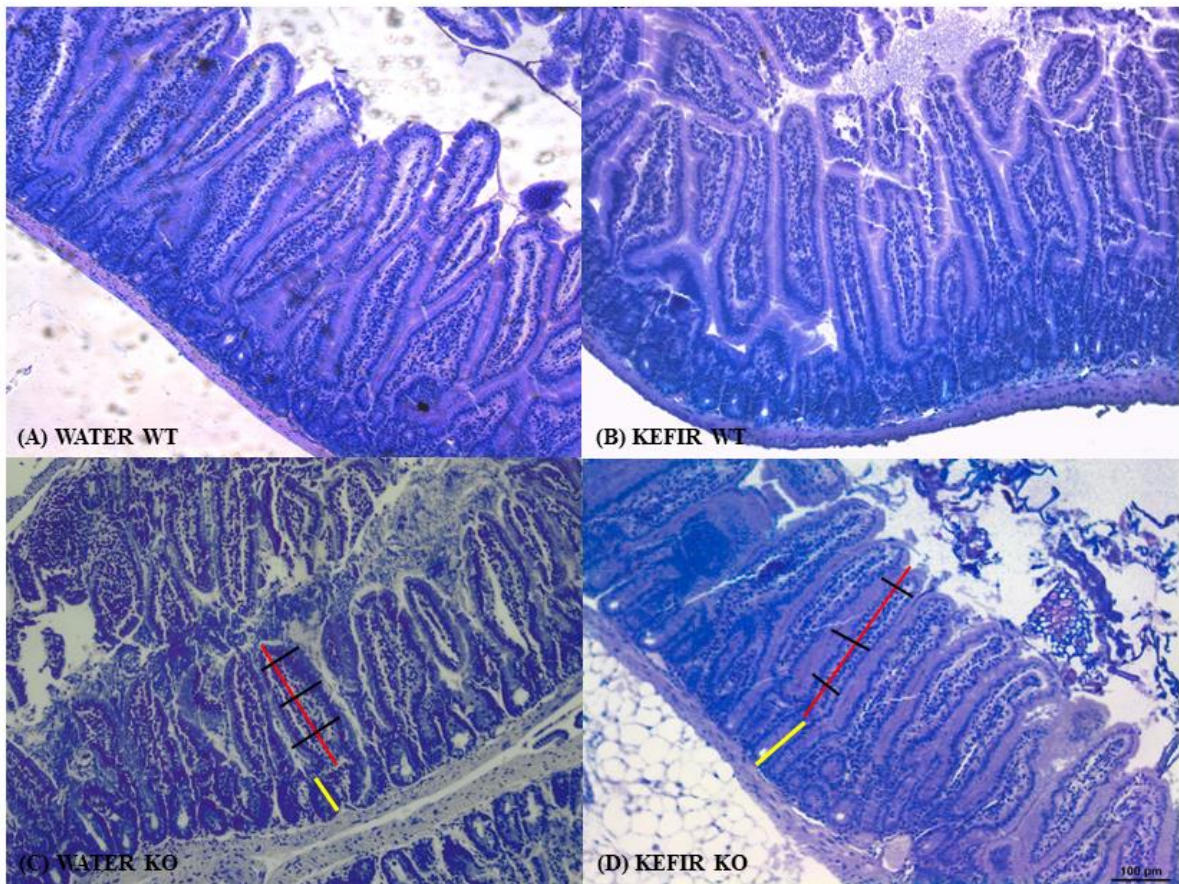


Fig 2 - Representations of the small intestine morphology of each group. Water WT group (A), Kefir WT group (B), Water KO group (C), and Kefir KO (D). Bar = 100 µm. Red line represents villus height; Black lines represent villus width measurements; Yellow line represents the depth of the crypts.

3.2 Kefir Increases SCFA'S in $IL10^{-/-}$ brain

The kefir treatment increases butyric acid, propionic acid, and acetic acid ($p < 0.001$) in the brain of $IL10^{-/-}$ mice compared to other groups. (Figure 3).

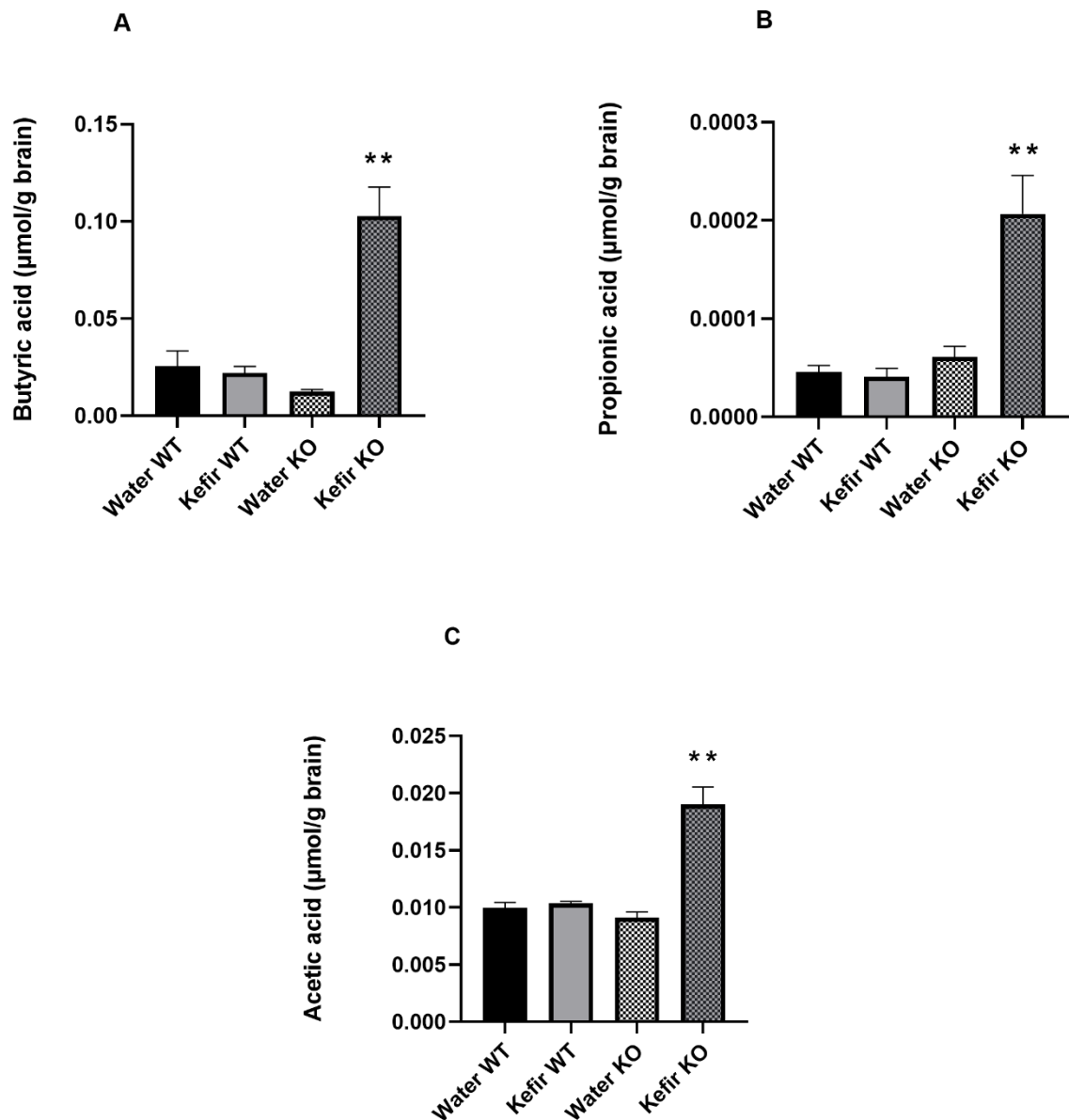


Fig 3 - Concentration of short-chain fatty acids in the brain.

Butyric acid (A), propionic acid (B), acetic acid (C). Results are expressed as mean \pm SEM (n = 5) and were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test. **p<0.001.

3.3 Brain Cytokine

The IL-10^{-/-} groups showed a higher concentration of cytokines IL-2, IL-4, TNF- α , IL-17a, and IFN- γ (p < 0.05) in the brain compared to WT groups (Figure 4). The other interleukins (IL-6 and IL-10) were not detected above the detection limit in the experimental groups and therefore were not mentioned.

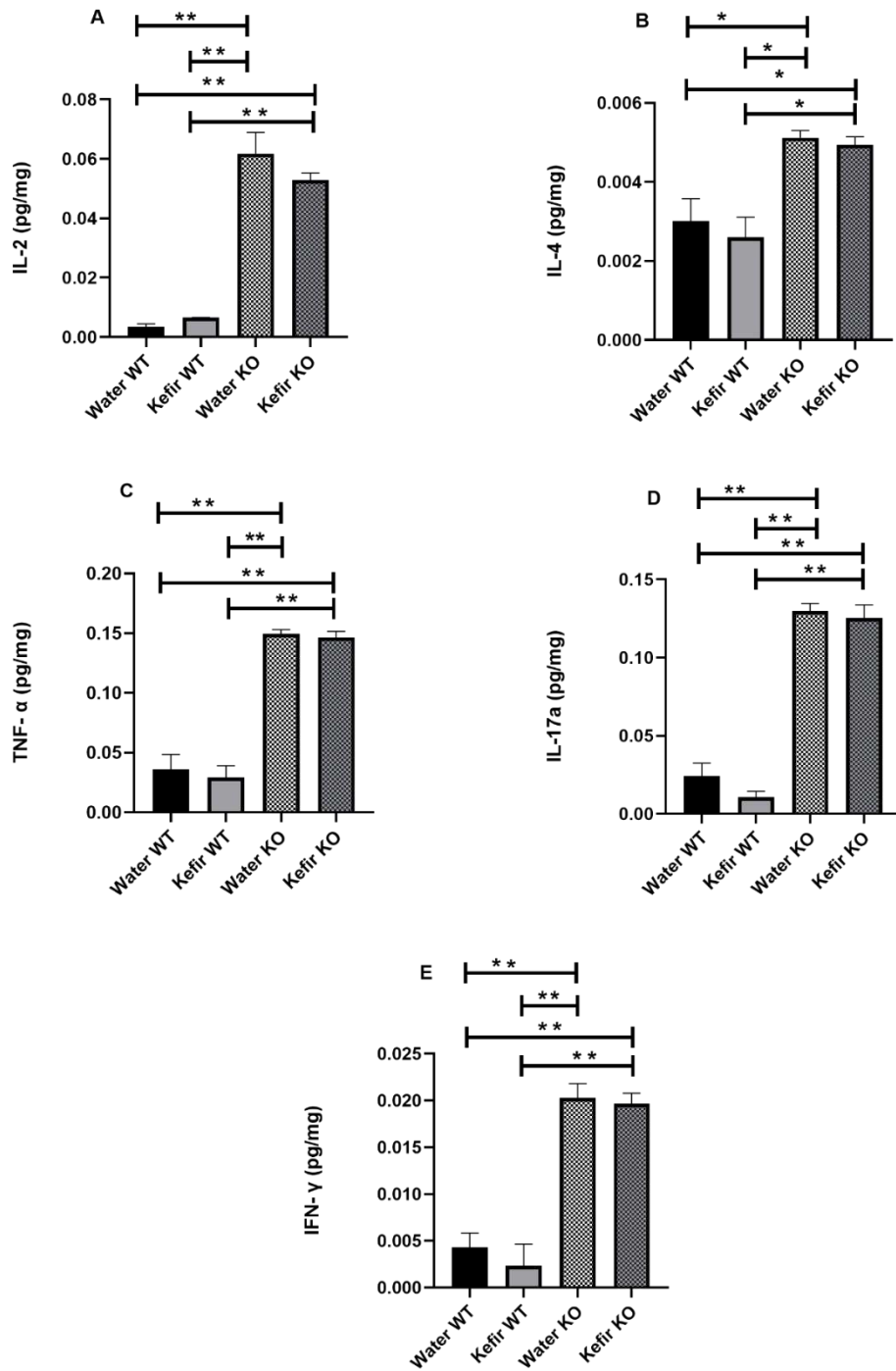


Fig 4 - Concentration of cytokines in the brain.

IL-2 (A), IL-4 (B), TNF-α (C), IL-17a (D), IFN-γ (E). Results are expressed as mean ± SEM (n = 5) and were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test. ns = no significant difference; *p < 0.05; **p < 0.001.

3.4 Antioxidant Activity in the Brain tissue

MDA level of IL10^{-/-} mice was significantly higher compared to wild-type groups ($p < 0.0001$), however, we verified that consumption of kefir was able to reduce MDA level in IL10^{-/-} mice compared to the WKO group ($p < 0.001$). Interestingly, GST concentration was significantly higher in the KWT group compared to others ($p = 0.0001$) (Figure 4). There was no significant difference in CAT and SOD levels between groups ($p > 0.05$) (Figure 5).

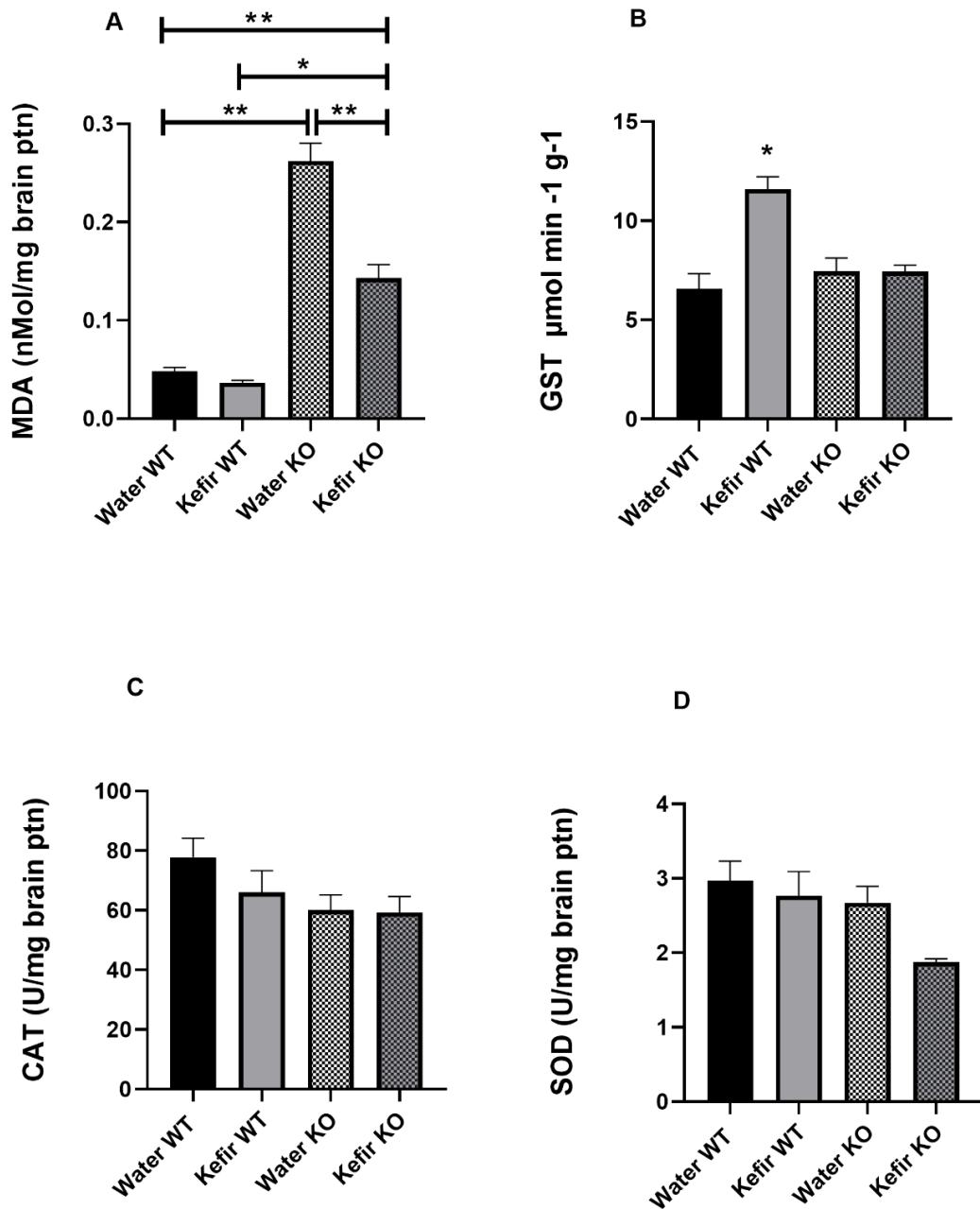


Fig 5 - Concentration of oxidative stress markers in the brain. Malondialdehyde (A), reduced glutathione (B), catalase (C), and superoxide dismutase (D). Results are expressed as mean \pm SEM (n = 5) and were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test. *p < 0.05; **p < 0.001.

3.5 Expression of Tight Junctions in the Brain tissue

The expression of zonulin and claudin-5 in the brain was higher in the WWT group compared to others (p < 0.005). On the other hand, the expression of occludin was higher in the KKO compared to KWT (p = 0.0065).

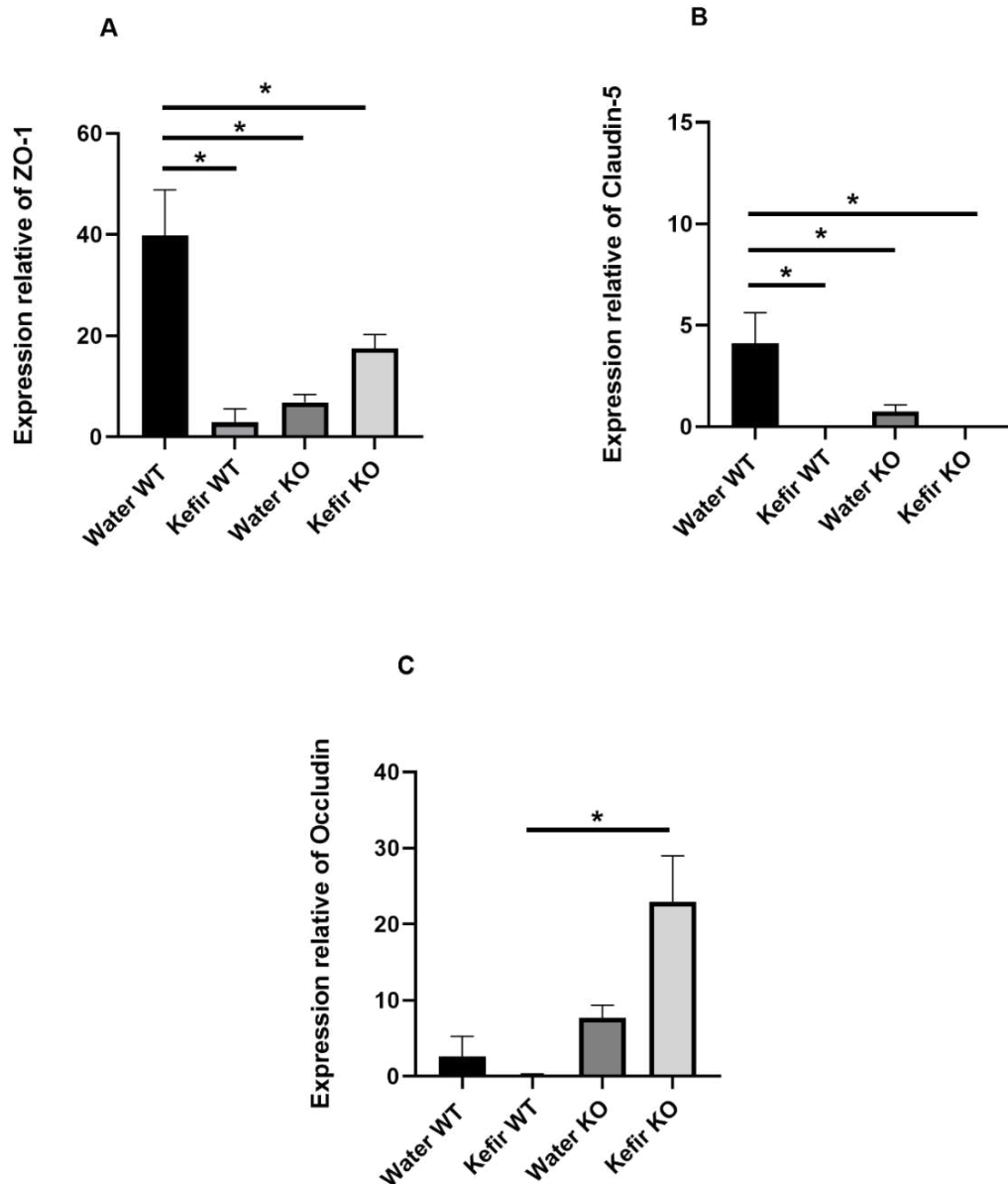


Fig 6 - Expression relative of tight junctions in the brain.

Zonulin (A), claudin (B), and occludin (C). Results are expressed as mean \pm SEM (n = 5) and were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test *p < 0.05.

4. Discussion

IL-10^{-/-} mice show typical inflammatory lesions that include epithelial hyperplasia, crypt abscesses, ulcers, mucin depletion, and intestinal wall thickening with infiltration of lymphocytes and other immune cells seen most severely in the colon, involving the small intestine to a lesser extent (Kühn et al., 1993; Zurita-Turk et al., 2020).

On the other hand, the morphology of a healthy intestine corresponds to wide and long villi, as well as a large surface area. These parameters generally indicate high nutrient absorption efficiency and strong pathogen defenses, which, in turn, prevent systemic and neuroinflammation (Chee et al., 2010; Xu et al., 2003).

In this study, the presence of inflammatory infiltrate was not observed in the small intestine probably because it is located in an extension of the intestine less affected by inflammation (Figure 2). However, the morphometric assessment of the small intestine revealed an increase in the villus height, surface area, and crypt depth within the KKO group compared to the WKO (Table 1; Figures 2 C and D). This result indicates that kefir activated the proliferation of enterocytes in the small intestine in a model of intestinal inflammation. Furthermore, besides the trophic effect of the kefir, these results demonstrate the possible benefit regarding the integrity of the intestinal epithelial barrier in IL10^{-/-} mice that can be considered an inflammation prevention effect. Intestinal barrier damage facilitates the entrance of gut bacteria-derived pathogens and toxins (e.g., LPS) into the circulatory system, resulting in blood-brain barrier (BBB) destruction and neuroinflammation.

Similarly, four weeks of kefir administration resulted greater villus height and villus width in the small intestine of rats when compared to the control (Rosa et al., 2014). Another study by our research group using kefir observed a reduction in hyperplasia and infiltration of inflammatory cells in the colonic mucosa and showed a significant reduction in the number and incidence of colon tumors on a model of colon cancer (de Almeida Brasiel et al., 2022). Furthermore, attenuation of inflammation and intestinal permeability improves symptoms in models of neuroinflammation (Kaur et al., 2020).

Some beneficial mechanisms of kefir include the direct inhibition of pathogens by acid and bacteriocin production, as well as the competitive exclusion of pathogens in the intestinal mucosa, and the strengthening of the physical and immunological barrier function of the intestine through the action of its metabolites, such as SCFAs (Akar et al., 2021).

In this context, Sun et al. (2018) showed that SCFAs in the gut impaired the pathogenic potential of gut microbiota antigen-specific Th1 cells in the induction of intestinal inflammation by promoting IL-10 production via Th1 cells.

The increase in circulating concentration of SCFA, especially butyrate, and its consequent arrival in the brain has been considered a potential mechanism by which probiotics would exert neuroprotective effects (Alpino et al., 2022). In addition to the well-known beneficial effects on the gut, SCFAs might directly influence the brain by crossing the BBB, reinforcing BBB integrity, inhibiting pathways associated with inflammatory responses, modulating neurotransmission and neurotrophic factors through a combination of mechanisms including the epigenetic (Dalile et al., 2019; Alpino et al., 2022). Here, we demonstrated that kefir consumption significantly increased the concentrations of SCFAs (butyric, propionic, and acetic) in the brain of the IL10^{-/-} group compared to the other groups. This result suggests that kefir consumption, beyond increasing endogenous production of butyrate, propionate, and acetate in IL10^{-/-} mice, probably contains a high concentration of SCFA since it is a fermented beverage.

Fermented foods can increase the plasma concentration of butyrate and, consequently, its reach to the brain (Gill et al., 2022). In the brain, SCFAs regulates the integrity of BBB, which is deeply associated with the controlled transition of substances from the circulation to the brain, playing a central role in CNS homeostasis (Braniste et al., 2014; Silva, Bernardi, and Frozza 2020). Tight junction proteins regulate the integrity of BBB by restricting paracellular diffusion of water-soluble substances from the blood to the brain (Hawkins and Davis, 2005) and consist mainly of transmembrane proteins such as claudins, and occludin, which are connected to the actin cytoskeleton by the zona occludens (ZO-1) (Tscheik et al., 2013). The increase in occludin expression in the KKO group compared to the KWT group may be associated with the increase in SCFAs induced by kefir consumption in IL-10^{-/-} mice. Braniste et al. (2014) demonstrated that exposure of germ-free adult mice to a bacteria that produce SCFAs up-regulated the expression of tight junction proteins and decreased of BBB permeability. A mix of probiotics containing *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Lactobacillus acidophilus* increased protein levels of occludin, claudin-5, ZO-1, and reduced neuroinflammation in aged mice compared to control (Yang et al., 2020).

Further, propionate protected the integrity of the BBB and led to the inhibition of a series of inflammatory pathways to microbial infections in vitro (Hoyles, et al., 2018). Interestingly, our results suggest that occludin expression does not depend on IL-10

and is probably pronounced in injury (Figure 7). On the other hand, the expression of ZO-1 and claudin-5 appears to depend on IL-10 signaling, and contrary to literature, this expression did not accompany the action of SCFAs in the KKO group. This result indicates more than one expression mechanism for these proteins in the brain. Indeed, ZO-1 appears to be Ca^{2+} and phosphate-dependent, as well as claudin-5 cAMP and protein kinase A-dependent (Hawkins & Davis, 2005).

In addition to the effects on the BBB, butyric acid prevents microglia activation and is associated with the reduction of inflammatory genes such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β (Capuco et al., 2020; Matt et al., 2018), whereas up-regulate IL-10 (Singh et al. 2014). However, the increase of butyrate in the KKO group was accompanied by the increase of inflammatory cytokines in brain tissue (Figure 2 and Figure 3) and the oral treatment with kefir was not sufficient to inhibit their expression in the brain of IL10^{-/-} mice.

Despite increased levels of inflammatory cytokines in the brain of IL10^{-/-} animals, the levels remained physiologically normal for the mice brain, which does not characterize a neuroinflammatory state yet (Seleme et al., 2017; Kaur et al., 2020). However, we believe that the absence of IL-10 up-regulated the inflammatory cytokines in the brain.

The mechanisms underlying the ability of IL-10 to inhibit inflammatory cytokine are known. Inhibition of IFN- γ secretion by Th1 cells is mediated by IL-10 through its action on macrophage APC function (Fiorentino et al., 1991b). Similarly, Benakis et al. (2016) demonstrated that IL-10 deficiency reduced the capacity of Treg cells to suppress IL-17⁺ $\gamma\delta$ T differentiation, increasing IL-17. IL-17a has also been implicated in intestinal inflammation, dysbiosis, brain injury, and human stroke. In addition, they demonstrated that dysbiosis was unable to confer neuroprotection in IL-10^{-/-} mice (Benakis et al., 2016).

Increased TNF- α is known as a potent key to the inflammatory cascade. IL-10 is also reported to suppress TNF- α and other proinflammatory in the brain by inhibiting microglial activation (Vitkovic et al., 2001; Joniec-Maciejak et al., 2014).

Thus, our results are in line with the role of IL-10 in brain anti-inflammatory activity (Lobo-Silva et al., 2016; Benakis et al., 2016; Saraiva et al., 2020). IL-10 limits neuronal damage during infection or other inflammatory processes, as well as in regulating brain homeostasis. IL-10 also has been associated with neuronal survival

and the modulation of neurogenesis. Administration of IL-10 evidenced beneficial for axon regeneration, through mechanisms that involve STAT3 and the regulation of NF- κ B signaling (Saraiva et al., 2020).

Moreover, probiotic supplementation was also unable to reduce TNF- α and others inflammatory cytokines in the brain tissue in a mouse model of Alzheimer's disease, but it was efficient in reducing TNF- α in the ileum (Kaur et al., 2020). Clinical investigation demonstrated that probiotic fermented milk from kefir grains supplementation (2 mL/kg/daily) for 90 days reduced TNF- α levels in the blood of Alzheimer's patients, which in turn prevents neuroinflammation (Ton et al., 2020). Administration of a mix of probiotics containing strains found in kefir *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Lactobacillus acidophilus* for 12 weeks was able to modulate aging-related gut microbiota dysbiosis, decreased neuroinflammation by lowering the levels of TNF- α , IL-6, and LPS in the brain, as well as improved the deficits of the MGB axis and cognitive function in senile mice (Yang et al., 2020). Taken together, these findings indicate that kefir requires an extended course of administration and probably a higher dose to be considered a psychobiotic, and perhaps it can requires an inflammation state to directly impact the neuroimmune system.

Regarding antioxidant activity in the brain, kefir consumption significantly reduced MDA increased by deficiency of IL-10 in the KKO group compared to the WKO group (Figure 5). MDA is an end product of lipid peroxidation and its elevation has been identified as the central mechanism of neurodegeneration in neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's disease. Similarly, *Lactobacilli* fermented cow's milk reduced MDA levels in the brain in mice induced to neuroinflammation by LPS (Musa et al., 2017). As aforementioned, intestinal inflammation and dysbiosis increase LPS in the circulatory system, which can induce neuroinflammation via the TLR-4 signaling pathway, leading to cognitive impairment (Zhao et al., 2019).

In addition, kefir consumption increased GST activity in the brain in WT mice compared to other groups (Figure 5). This result suggests that GST activity in the brain is stimulated in the presence of IL-10 and by kefir consumption. Indeed, Wang et al. (2022) demonstrated an increase in anti-inflammatory activity mediated by the upregulation of IL-10 and GST, suggesting cooperation of the activity of both. In

agreement with this finding, Musa et al., (2017) also verified an increase in GST in the brain of mice after the consumption of fermented milk probiotics.

Propionate regulates the Treg cell population and consequently reduces the systemic immune reaction, improving neurodegeneration and other chronic disease (Duscha et al., 2020). One of the regulatory mechanisms of PA-induced Treg cells requires IL-10 presence, indicating IL-10 potential biological importance in coordinating cellular response to propionic acid (Duscha et al., 2020).

In this study, the increase in the level of propionic acid in the brain after kefir consumption in IL10^{-/-} mice (Figure 4) did not reduce the expression of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-17a, IFN- γ and IL-2 induced by lack of IL-10 (Figure 3), providing further evidence of the role of IL-10 in SCFA- mediated immune regulation.

Another correlation between SCFAs and IL-10 is the conversion of acetate into acetyl-CoA, leading to the integration of SCFAs into the cellular metabolism, which boosts mTOR activation. This process in turn facilitates the differentiation of T cells into TH1 cells, TH17 cells, and IL-10⁺ T cells, increasing IL-10 (Chen et al., 2014). Zheng et al. (2021) revealed that long-term acetate deficiency impairs memory and learning in the hippocampus of rats, indicating the role of acetate in cognition (Zheng et al., 2021).

Acetic acid also increased in the KKO group compared to the others (Figure 4), indicating that kefir consumption increased all SCFAs in the brain in IL10^{-/-} mice, which in turn represents a neuroprotective effect, although the effects triggered by SCFA are at least in part dependent on IL-10. The increase in SCFA in the brain suggests an increase in systemic circulation in IL-10^{-/-} mice.

We believe that the intestinal inflammatory state induced by the lack of IL-10 reduced the metabolism of SCFA by the gut, favoring the pathway of circulation and consequently the arrival to the brain in an attempt to suppress the lack of IL-10. In wild-type animals, SCFAs were probably used extensively by the gut as expected in health conditions (Alpino et al., 2022).

5. Conclusion

Kefir consumption improved small intestine morphometry in IL-10^{-/-} mice, suggesting greater integrity of the intestinal epithelial barrier and better intestinal defense compared to the water group. This result can be considered a preventive neuroprotective result since impaired intestinal integrity and immunity are associated with systemic inflammation and neuroinflammation. Moreover, kefir consumption increased SCFAs levels and reduced MDA levels in the brains of IL-10^{-/-} mice, revealing a neuroprotective effect, although the anti-inflammatory response in the brain has been shown to depend on IL-10 in a model of intestinal inflammation. Our results reinforce the central role of IL-10 in immunological homeostasis that goes beyond the intestinal site, revealing that it is also crucial for brain homeostasis. Regarding the potential psychobiotic effect of kefir, we believe that a longer administration time and a higher dose of the probiotic improves the direct effects on the brain.

6. References

- Agarwal, N., Shukla, V., Kolba, N., Jackson, C., Cheng, J., Padilla-Zakour, O. I., & Tako, E. (2022). Comparing the Effects of Concord Grape (*Vitis labrusca* L.) Puree, Juice, and Pomace on Intestinal Morphology, Functionality, and Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, *14* (17), 3539.
- Akar, F., Sumlu, E., Alçığır, M. E., Bostancı, A., & Sadi, G. (2021). Potential mechanistic pathways underlying intestinal and hepatic effects of kefir in high-fructose-fed rats. *Food Research International*, *143*, 110287.
- Alpino, G. D. C. Á., Pereira-Sol, G. A., Dias, M. D. M. E., Aguiar, A. S. D., & Peluzio, M. D. C. G. (2022). Beneficial effects of butyrate on brain functions: A view of epigenetic. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-10.
- Ansari, F., Pourjafar, H., Tabrizi, A., & Homayouni, A. (2020). The effects of probiotics and prebiotics on mental disorders: a review on depression, anxiety, Alzheimer, and autism spectrum disorders. *Current pharmaceutical biotechnology*, *21*(7), 555-565.
- Benakis, C., Brea, D., Caballero, S., Faraco, G., Moore, J., Murphy, M., Sita, G., Racchumi, G., Pamer, E. G., Iadecola, C., et al. (2016). Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nature medicine*, *22*(5), 516-523.

- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, N., Bakocevic, L., Guan Ng, P., Gundu, et al ... & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, 6(263), 263ra158-263ra158.
- Capuco, A., Urits, I., Hasoon, J., Chun, R., Gerald, B., Wang, J. K., Ngo A.L., Simopoulos, T., Kaye, A.D., Colantonio, M.M., et al. (2020). Gut microbiome dysbiosis and depression: A comprehensive review. *Current pain and headache reports*, 24(7), 1-14.
- Chee, S. H., Iji, P. A., Choct, M., Mikkelsen, L. L., & Kocher, A. (2010). Characterisation and response of intestinal microflora and mucins to manno-oligosaccharide and antibiotic supplementation in broiler chickens. *British poultry science*, 51(3), 368-380.
- Chen, H. L., Hung, K. F., Yen, C. C., Laio, C. H., Wang, J. L., Lan, Y. W., ... & Chen, C. M. (2019). Kefir peptides alleviate particulate matter < 4 µm (PM4. 0)-induced pulmonary inflammation by inhibiting the NF-κB pathway using luciferase transgenic mice. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Chen, S., Liu, D., Wu, J., Xu, B., Lu, K., Zhu, W., & Chen, M. (2014). Effect of inhibiting the signal of mammalian target of rapamycin on memory T cells. *Transplantation Proceedings*, 46(5), 1642-1648.
- Chen, W., Wang, J., Du, L., Chen, J., Zheng, Q., Li, P., Du, B., Fang, X., & Liao, Z. (2022). Kefir microbiota and metabolites stimulate intestinal mucosal immunity and its early development. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14.
- Cruz, B. C. D. S., Conceição, L. L. D., Mendes, T. A. D. O., Ferreira, C. L. D. L. F., Gonçalves, R. V., & Peluzio, M. D. C. G. (2020). Use of the synbiotic VSL# 3 and yacon-based concentrate attenuates intestinal damage and reduces the abundance of *Candidatus Saccharimonas* in a colitis-associated carcinogenesis model. *Food Research International*, 137, 109721-109721.
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(8), 461-478.
- de Almeida Brasiel, P. G., Luquetti, S. C. P. D., Medeiros, J. D., do Amaral Corrêa, J. O., Machado, A. B. F., Moreira, A. P. B., Rocha, V. N., Teodoro de Souza, C., & Peluzio,

- M. D. C. G. (2022). Kefir modulates gut microbiota and reduces DMH-associated colorectal cancer via regulation of intestinal inflammation in adulthood offsprings programmed by neonatal overfeeding. *Food Research International*, *152*, 110708.
- de Moreno de LeBlanc, A., Del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Santos Rocha, C., Van De Guchte, M., Azevedo, V., Miyoshi, A., & LeBlanc, J. G. (2011). Importance of IL-10 modulation by probiotic microorganisms in gastrointestinal inflammatory diseases. *International Scholarly Research Notices*, *2011*.
- Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, *101*(1), 33-39.
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *The Journal of physiology*, *595*(2), 489-503.
- Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G. I., Eilers, E., Bader, V., Haase, S., Kaisler, J., David, C., et al (2020). Propionic acid shapes the multiple sclerosis disease course by an immunomodulatory mechanism. *Cell*, *180*(6), 1067-1080.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., & O'garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *The Journal of Immunology*, *146*(10), 3444-3451.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., et al. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications*, *5*(1), 1-11.
- Gill, P. A., Muir, J. G., Gibson, P. R., & van Zelm, M. C. (2022). A randomized dietary intervention to increase colonic and peripheral blood SCFAs modulates the blood B- and T-cell compartments in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *116*(5), 1354-1367.

- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, *249*(22), 7130-7139.
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*, *57*(2), 173-185.
- Hoyles, L., Snelling, T., Umlai, U. K., Nicholson, J. K., Carding, S. R., Glen, R. C., & McArthur, S. (2018). Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. *Microbiome*, *6*(1), 1-13.
- Hugo, A., & Lester, P. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, *105*, 121-126.
- Kandasamy, S., Vlasova, A. N., Fischer, D. D., Chattha, K. S., Shao, L., Kumar, A., S. N. Langel, A. Rauf, H. C. Huang, G. Rajashekara, et al. (2017). Unraveling the differences between gram-positive and gram-negative probiotics in modulating protective immunity to enteric infections. *Frontiers in immunology*, *8*, 334.
- Kaur, H., Nagamoto-Combs, K., Golovko, S., Golovko, M. Y., Klug, M. G., & Combs, C. K. (2020). Probiotics ameliorate intestinal pathophysiology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *92*, 114-134.
- Kesika, P., Suganthy, N., Sivamaruthi, B. S., & Chaiyasut, C. (2021). Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life sciences*, *264*, 118627.
- Kowalski, K., & Mulak, A. (2019). Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *Journal of neurogastroenterology and motility*, *25*(1), 48.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, *75*(2), 263-274.
- Liu, M., Xie, W., Wan, X., & Deng, T. (2020). Clostridium butyricum modulates gut microbiota and reduces colitis associated colon cancer in mice. *International immunopharmacology*, *88*, 106862.
- Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., & Saraiva, M. (2016). Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of neuroinflammation*, *13*(1), 1-10.

- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-75.
- Matt, S. M., Allen, J. M., Lawson, M. A., Mailing, L. J., Woods, J. A., & Johnson, R. W. (2018). Butyrate and dietary soluble fiber improve neuroinflammation associated with aging in mice. *Frontiers in immunology*, 1832.
- MAPA. Ministério agricultura, pecuária e abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. Acessado em fevereiro de 2023 <<https://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2019/09/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N-46-de-23-de-outubro-de-2007-Leites-Fermentados.pdf>>
- Mendes, D. O., Bartholomeu, D. C., and Gazzinelli, R. T. (2013). Identification of strain-14 specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and 15 high-throughput immunoscreening with peptide Arrays. *Plos*, 7.
- Mocellin, S., Marincola, F., Rossi, C. R., Nitti, D., & Lise, M. (2004). The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(1), 61-76.
- Musa, N. H., Mani, V., Lim, S. M., Vidyadaran, S., Majeed, A. B. A., & Ramasamy, K. (2017). Lactobacilli-fermented cow's milk attenuated lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Research*, 84(4), 488-495.
- Rosa, D. D., Peluzio, M. do C. G., Bueno, T. P., Cañizares, E. V., Miranda, L. S., Dorbigny, B. M., Dubí, D. C., Castaño, I. E., Grzeskowiak, Ł. M., & Ferreira, C. L. de L. F. (2014). Evaluación de la toxicidad subcrónica del kéfir por administración oral en ratas Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 29(6), 1352-1359.
- Saraiva, M., Vieira, P., & O'garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1).
- Seleme, M. C., Kosmac, K., Jonjic, S., & Britt, W. J. (2017). Tumor necrosis factor alpha-induced recruitment of inflammatory mononuclear cells leads to inflammation and altered brain development in murine cytomegalovirus-infected newborn mice. *Journal of virology*, 91(8), e01983-16.

- Sharma, A. R., Batra, G., Saini, L., Sharma, S., Mishra, A., Singla, R., Singh, A., Singh, R. S., Jain, A., Bansal, S., Modi, M., & Medhi, B. (2021). Valproic Acid and Propionic Acid Modulated Mechanical Pathways Associated with Autism Spectrum Disorder at Prenatal and Neonatal Exposure. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 21(5), 399–408.
- Sherry, C. L., S. S. Kim, R. N. Dilger, L. L. Bauer, M. L. Moon, R. I. Tapping, G. C. Fahey, Jr., K. A. Tappenden, and G. C. Freund. (2010). Sickness behavior induced by endotoxin can be mitigated by the dietary soluble fiber, pectin, through up-regulation of IL-4 and Th2 polarization. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(4), 631–40.
- Siegfried, R., Ruckemann, H., & Stumpf, G. (1984). Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography. *Landwirtschaftliche Forschung*, 37(3-4), 298-304.
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in endocrinology*, 11, 25.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H. et al. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, 40(1), 128-139.
- Sivamaruthi, B. S., Suganthy, N., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2020). The role of microbiome, dietary supplements, and probiotics in autism spectrum disorder. *International journal of environmental research and public health*, 17(8), 2647.
- Sun, M., Wu, W., Chen, L., Yang, W., Huang, X., Ma, C., ... & Cong, Y. (2018). Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nature communications*, 9(1), 1-15.
- Sun, Y., Geng, W., Pan, Y., Wang, J., Xiao, P., & Wang, Y. (2019). Supplementation with *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota. *Food & function*, 10(2), 925-937.
- Ton, A. M. M., Campagnaro, B. P., Alves, G. A., Aires, R., Côco, L. Z., Arpini, C. M., Guerra E Oliveira, T., Campos-Toimil, M., Meyrelles, S. S., Pereira, T. M. C., & Vasquez, E.

- C. (2020). Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Tscheik, C., Blasig, I. E., & Winkler, L. (2013). Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue barriers*, 1(2), e24565.
- Vitkovic, L., Maeda, S., & Sternberg, E. (2001). Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation*, 9(6), 295-312.
- Wang, Z., Liang, M., Li, H., Liu, B., & Yang, L. (2022). Rice protein suppresses 4-hydroxy-2-nonenal-induced inflammation owing to methionine availability. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, (ja).
- Wang, X., Wong, K., Ouyang, W., & Rutz, S. (2019). Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(2), a028548.
- Xu, Z. R., Hu, C. H., Xia, M. S., Zhan, X. A., & Wang, M. Q. (2003). Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry science*, 82(6), 1030-1036.
- Yang, X., Yu, D., Xue, L., Li, H., & Du, J. (2020). Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(3), 475-487.
- Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., Lu, D., Wei, W., Wang, Y., Li, H., Fu, Y., & Zhu, L. (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Zheng, H., Xu, P., Jiang, Q., Xu, Q., Zheng, Y., Yan, J., et al. (2021). Depletion of acetate-producing bacteria from the gut microbiota facilitates cognitive impairment through the gut-brain neural mechanism in diabetic mice. *Microbiome*, 9(1), 1-19.
- Zurita-Turk, M., Mendes Souza, B., Prósperi de Castro, C., Bastos Pereira, V., Pecini da Cunha, V., Melo Preisser, T., et al. (2020). Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. *BMC biotechnology*, 20(1), 1-12.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados expandem o conhecimento sobre o papel do kefir na neuroproteção em modelo de inflamação intestinal. O consumo de kefir demonstrou ter efeitos neuroprotetores indireto e direto. Indireto pois o consumo de kefir aumentou a área de superfície das vilosidades e altura de vilosidades nos animais *knockout* IL-10 comparado ao grupo controle, o que sugere uma recuperação da morfometria intestinal induzida pela ausência da IL-10 e melhora de função de barreira, o que está associado com melhor resposta imune intestinal e, conseqüentemente, preservação das funções cerebrais através do eixo intestino-microbiota-cérebro.

De forma direta, o consumo de kefir nos animais *knockout* IL-10 aumentou a concentração de AGCC no tecido cerebral, o que está associado com a promoção de funções neuroprotetoras e foi associado com aumento da expressão da proteína de junção epitelial ocludina que atua na integridade da BHE preservando a homeostase cerebral e com a redução de MDA no cérebro dos animais *knockout*.

No entanto, o aumento dos AGCC no grupo KKO não foi suficiente para reduzir o aumento das citocinas inflamatórias no tecido cerebral no grupo *knockout* pois as ações dos AGCC na inibição inflamatória é mediada, pelo menos em parte, pela IL-10 no cérebro. Portanto, nossos achados suportam que as ações neuroprotetoras preventivas mediadas pelo consumo do kefir são pronunciadas na presença de IL-10. Além disso, nós supomos que o tempo de tratamento do kefir pode ter sido insuficiente para promover ação direta psicobiótica.

Em relação aos mecanismos moleculares do butirato nas funções cerebrais envolve-se a sinalização do GPCR, ações epigenéticas e metabólicas. O butirato melhora a barreira intestinal, a regulação hormonal e ativação da resposta imunomoduladora, que por sua vez influencia funções cerebrais através do nervo vago e vias humorais, prevenindo a inflamação sistêmica. Além disso, o butirato pode atravessar a BHE e provavelmente atuar diretamente com o cérebro.

Portanto, o consumo de kefir pode ser considerada uma estratégia promissora e de baixo custo para prevenção de doenças neurológicas visto a sua capacidade de modulação da microbiota intestinal, reforço imunológico e aumento da concentração de metabólitos neuroativos como os AGCC.

9. ANEXO

9.1 Coautoria em trabalhos

Artigo submetido à publicação no periódico Applied Microbiology and Biotechnology (Factor de impacto: 5.46)

Applied Microbiology and Biotechnology
Milk kefir modulates the microbiota-gut-brain axis by increasing short-chain fatty acids in mice
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AMAB-D-23-00004
Full Title:	Milk kefir modulates the microbiota-gut-brain axis by increasing short-chain fatty acids in mice
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Genomics, transcriptomics, proteomics
Corresponding Author:	Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Ph.D. Universidade Federal de Vicosa BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Vicosa
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Mariana de Fátima Albuquerque Pereira, Master
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Mariana de Fátima Albuquerque Pereira, Master Larissa Gabriela Morais de Ávila, Master Gabriela de Cássia Ávila Alpino Bruna Cristina dos Santos Cruz, Ph.D. Lucas Filipe Almeida, Master Jordana Macedo Simões Andressa Ladeira Bernardes, Ph.D. Iasmim Xisto Campos Andréa de Oliveira Barros Ribon, Ph.D. Tiago Antônio de Oliveira Mendes, Ph.D. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Kefir is a fermented beverage made of a symbiotic microbial community that stands out for health benefits. Although its microbial profile still little explore, its effects on modulation of gut microbiota and production of short-chain fatty acids (SCFAs) seems to act improving brain health. This work aimed to analyze the microbiota profile of milk kefir and its effect on metabolism, oxidative stress, and in the microbiota-gut-brain axis in a murine model. The experimental design was carried out using C57BL6 mice (n=20) subdivided into groups that received 0.1mL water or 0.1 mL (10% w/v) kefir. The kefir proceeded to maturation for 48 hours, and then it was orally administered, via gavage, to the animals for 4 weeks. Physicochemical, microbiological, antioxidant analyzes, and microbial profiling of milk kefir beverage were performed as well as growth parameters, food intake, serum markers, oxidative stress, antioxidant enzymes, SCFAs, and metagenomics were analyzed in the mice. Milk kefir had 76.64 ± 0.42% of free radical scavenging and the microbiota composed primarily by the genus Comamonas. Moreover, kefir increase catalase and superoxide dismutase (colon), SCFAs in feces (butyrate), and in the brain (butyrate and propionate). Kefir reduced

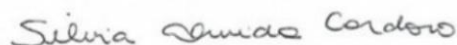
9.2 Aprovação do Comitê de Ética

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 35/2020, intitulado “**Resposta inflamatória, antioxidante e alteração intestinal em modelo murino C57BL-6 consumindo kefir de leite desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**”, coordenado pelo professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 24/11/2020, com validade de 2 anos.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 34/2020, named “**Inflammatory, antioxidant and intestinal changes in a murine model C57BL-6 consuming milk kefir challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on November 24, 2020 valid for 2 years.



Prof. ª Sílvia Almeida Cardoso
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

9.3 Cálculo amostral

O cálculo amostral a seguir foi realizado no projeto guarda-chuva.

O tamanho amostral foi calculado baseando-se na comparação entre os valores de duas médias de referência. Para isso utilizou-se a fórmula de Mera et al., 1998:

$$N = \frac{2 \times (t_{\alpha/2} \times \sigma)^2}{d^2}$$

Onde:

$t_{\alpha/2}$ = valor da tabela de distribuição t (*two-tailed*) σ =

Desvio padrão;

d = diferença que se deseja obter no estudo

Adotou-se o nível de confiança de 95% ($\alpha < 0,05$) obtendo um valor da tabelle de distribuição t (*two-tailed*) = $t_{\alpha/2} = 1,7171$ com poder estatístico de 95% e gl= 24-2 = 22.

Durante a infecção intracelular, os fagócitos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), importantes para matar o patógeno. Dessa maneira, foi utilizada como variável principal o valor de um índice de estresse oxidativo (com desvios padrão), os peróxidos de lipídeos (LPO), na mucosa do íleo em camundongos desafiados com *S. Typhimurium* e tratados com ofloxacina e / ou o probiótico *L. fermentum* ME-3.

Os valores de LPO foram retirados da tabela adaptada, abaixo demonstrado no quadro 3, do estudo de Truusalu et al (2008) e foram utilizados para os cálculos abaixo:

Quadro 3: Níveis de peróxido de lipídeos

	Control (PBS)	Gr3 (ST+ME-3)	Media \pm DP
LPO (pmol/mg proteína)	157 \pm 24	169 \pm 11	163 \pm 17, 5
N	11	13	-

ST – *Salmonella Typhimurium*; ME-3 – *Lactobacillus fermentum* ME-3; PBS –

phosphate buffered saline; LPO – *lipid peroxides*; n = 11 ou 13.

Assim, tem-se que:

- A média do número de animais: $11+13 = 24/2 = 12$ animais/ grupo
- Total de animais: $12 \times 10 = 120$ animais
- Média do desvio padrão de todos os grupos: 17,5 animais
- Considerando o grupo tratamento com PBS e o grupo com infecção com *Salmonella* e tratamento com *Lactobacillus fermentum* ME-3;

Cálculo do tamanho amostral:

$$N = \frac{2 \times (1,7171 \times 17,5)^2}{12^2} = 12 \text{ animais/grupo}$$

Assim, o tamanho da amostra encontrado foi de 12 animais por grupo. Considerando que o estudo consistirá em 5 grupos experimentais por delineamento experimental: grupo água não infectado (ANI) que receberá dieta comercial e gavagem com água filtrada; grupo água infectado (AI) que receberá dieta comercial, gavagem com água filtrada e o inóculo de *Salmonella* (10^6 UFC/mL); grupo antibiótico infectado (ATI) que receberá dieta comercial, gavagem com enrofloxacina (20ppm) e o inóculo de *Salmonella* (10^6 UFC/mL); grupo kefir infectado (KI) que receberá dieta comercial, gavagem com kefir de leite (10% vol./vol.) e o inóculo de *Salmonella* (10^6 UFC/mL); grupo kefir não infectado (KNI) que receberá dieta comercial e gavagem com kefir de leite (10% vol./vol.), serão necessários 120 animais.