

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

LUCAS HASSIB CAMINA

**Efeitos da disbiose entérica gestacional e neonatal durante o neurodesenvolvimento sobre
o comportamento e a expressão gênica da prole**

Ribeirão Preto

2023

LUCAS HASSIB CAMINA

Efeitos da disbiose entérica gestacional e neonatal durante o neurodesenvolvimento sobre o comportamento e a expressão gênica da prole

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Saúde Mental

Orientador:

Dr. Frederico Rogério Ferreira

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Camina, Lucas Hassib

Efeitos da disbiose entérica gestacional e neonatal durante o neurodesenvolvimento sobre o comportamento e a expressão gênica da prole. Ribeirão Preto, 2023.

95 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde Mental.

Orientador: Rogério Ferreira, Frederico

1. Microbiota. 2. Estresse. 3. Neurodesenvolvimento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CAMINA, Lucas Hassib

Título: Efeitos da disbiose entérica gestacional e neonatal durante o neurodesenvolvimento sobre o comportamento e a expressão gênica da prole

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A quem devo minha vida e incentivo contínuo à educação e à conquista dos meus sonhos: minha mãe e minha avó, Roberta e Cleuza.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Frederico, por toda a orientação e ensinamentos ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao Dr. Francisco, por ter me acolhido em seu laboratório e permitido o desenvolvimento da minha pesquisa.

A CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A minha família, por estar sempre ao meu lado me incentivando sem nunca me deixar desistir, mesmo quando tudo parece completamente difícil e, até mesmo, impossível.

Aos meus amigos e amigas do Rio de Janeiro por seguirem me apoiando mesmo à distância.

Aos meus amigos e amigas de Ribeirão, por estarem comigo nos melhores e nos piores momentos. Sem vocês eu não teria concluído esse mestrado.

E aos camundongos: espero que a vida de vocês tenha tido um propósito maior.

**“A primeira condição para modificar a realidade
consiste em conhecê-la”**

Eduardo Galeano

RESUMO

HASSIB, L. C.; FERREIRA, F. R. **Efeitos da disbiose entérica gestacional e neonatal durante o neurodesenvolvimento sobre o comportamento e a expressão gênica da prole.** 2023. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

As alterações na microbiota intestinal, conhecidas como disbiose, aparentam ter uma influência significativa no neurodesenvolvimento do hospedeiro, podendo contribuir para a neurobiologia de diversos transtornos psiquiátricos. A interação entre o microbioma do hospedeiro e seu Sistema Nervoso Central (SNC) é bidirecional, ocorrendo através do eixo Cérebro-Intestino-Microbiota (CIM), no qual o estresse desempenha um papel fundamental como fator modulador, sobretudo no perfil dos microrganismos. Embora os mecanismos de interação do eixo CIM tenham sido objeto de diferentes estudos notáveis, ainda é necessário esclarecer a janela temporal em que a disbiose pode causar maiores prejuízos no neurodesenvolvimento. Com esse objetivo, o presente estudo investigou os impactos da disbiose intestinal durante a gestação ou no período neonatal no comportamento e na expressão gênica da prole nos períodos pré e pós-puberal. Para isso, fêmeas gestantes ou camundongos neonatos a partir de P.04 foram submetidos ao Transplante de Microbiota Fecal (TMF), utilizando fezes provenientes de animais submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Variado (ECV). Os filhotes foram então submetidos a testes comportamentais e eutanasiados para a extração de amostras de córtex e hipocampo com 21 ou 55 dias. Aos 21 dias, os filhotes das fêmeas que receberam as fezes provenientes de animais submetidos ao ECV durante a gestação apresentaram um menor número de comportamentos de avaliação de risco no teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), maior tempo de imobilidade no teste de Suspensão pela Cauda (SC) e realizaram o comportamento de *grooming* facial em menor número de vezes no teste de *Spray* de Sacarose (SS) em comparação aos filhotes de fêmeas que receberam fezes de animais controle saudáveis. Com 55 dias, os filhotes que sofreram a disbiose durante a gestação exibiram um maior número de comportamentos de avaliação de risco no LCE, maior latência para começar a comer no teste de Inibição da Alimentação Induzida pela Novidade (IAIN) e para realizar o primeiro *grooming* facial no SS, no qual também realizaram um menor número de *groomings* faciais. Aos 21 dias, os filhotes apresentaram reduções significativas na expressão de Sinapsina 1, Olig 1 e Sox 2 no hipocampo, genes relacionados à comunicação sináptica, oligodendrogênese, formação de interneurônios gabaérgicos e manutenção da pluripotência e metabolismo neuronal. Os animais que sofreram o TMF durante o período neonatal apresentaram prejuízos comportamentais em todos os testes realizados (IAIN, LCE, SC e SS), tanto com 21 quanto com 55 dias. Entretanto, nesses grupos não foram observadas as mesmas reduções na expressão de RNAm vistas nos animais que sofreram a disbiose gestacional. Esses resultados sugerem que tanto a disbiose perigestacional quanto a neonatal produzem alterações comportamentais compatíveis com os transtornos comportamentais associados à ansiedade e depressão, que podem estar relacionadas a alterações neuroestruturais ou de neurodesenvolvimento envolvendo a sinaptogênese, oligodendrogênese, metabolismo neural ou diferenciação de interneurônios gabaérgicos. A determinação da composição da microbiota entérica dos diferentes grupos analisados está sendo realizada para identificação dos grupos de microrganismos alterados pelo TMF.

Palavras chave: microbiota, estresse, neurodesenvolvimento

ABSTRACT

HASSIB, L. C.; FERREIRA, F. R. **Effects of gestational and neonatal enteric dysbiosis during neurodevelopment on offspring behavior and gene expression.** 2023. 95 p. Dissertation (Master's) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Alterations in the gut microbiota, known as dysbiosis, appear to have a significant influence on the host's neurodevelopment, potentially contributing to the neurobiology of various psychiatric disorders. The interaction between the host's microbiome and its Central Nervous System (CNS) is bidirectional and occurs through the Microbiota-Gut-Brain (MGB) axis, where stress plays a fundamental modulatory role, including in the profile of microorganisms. Although the mechanisms of interaction in the BGM axis have been the focus of several notable studies, the temporal window in which dysbiosis may cause greater impairments in neurodevelopment needs to be elucidated. Therefore, this study aims to investigate the impacts of intestinal dysbiosis during gestation or the neonatal period on the behavior and gene expression of offspring during pre- and post-puberty periods. To achieve this, pregnant female or neonate mice from P.04 underwent Fecal Microbiota Transplantation (FMT) with feces from animals subjected to the Chronic Variable Stress (CVS) protocol, and the offspring were subjected to behavioral tests and euthanized for sample extraction from the cortex and hippocampus at 21 or 55 days. At 21 days, offspring from females that received feces from animals subjected to CVS during gestation showed a reduced number of risk assessment behaviors in the Elevated Plus Maze (EPM) test, increased immobility time in the Tail Suspension Test (TST), and performed the facial grooming behavior less frequently in the Sucrose Spray Test (SST) compared to offspring from females that received feces from healthy control animals. At 55 days, offspring that experienced dysbiosis during gestation exhibited an increased number of risk assessment behaviors in the EPM test and longer latencies to begin eating in the Novelty-Induced Feeding Inhibition Test (NIFIT) and to perform the first facial grooming in the SST, where they also exhibited a reduced number of facial groomings. At 21 days, the offspring showed significant reductions in the hippocampal expression of Synapsin 1, Olig 1, and Sox 2 genes, which are related to synaptic communication, oligodendrogenesis, the formation of GABAergic interneurons, pluripotency maintenance, and neuronal metabolism. Animals subjected to FMT during the neonatal period presented behavioral impairments in all tests conducted (NIFIT, EPM, TST, and SST) at both 21 and 55 days. However, these groups did not show the same reductions in mRNA expression observed in animals that experienced gestational dysbiosis. These results suggest that both perigestational and neonatal dysbiosis produce behavioral alterations consistent with anxiety and depression-related behavioral disorders, which may be associated with neurostructural or neurodevelopmental changes involving synaptogenesis, oligodendrogenesis, neural metabolism, or differentiation of GABAergic interneurons. The determination of the composition of the enteric microbiota of the different analyzed groups is currently being performed to identify the groups of microorganisms altered by FMT.

Keywords: microbiota, stress, neurodevelopment

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. A Teoria do Holobionte: um breve retrospecto sobre o estudo da microbiota humana	13
1.2. Comunicação entre cérebro e intestino.....	15
1.2.1. Nervos e neurotransmissores	15
1.2.2. Sistema Imune.....	17
1.2.3. Vias endócrinas e metabólicas	19
1.3. A microbiota materna e o neurodesenvolvimento.....	22
1.4. O estresse e a disbiose impactam o neurodesenvolvimento e a saúde mental.....	25
1.5. Hipótese	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Indução de disbiose entérica em animais adultos por meio do protocolo de Estresse Crônico Variado.....	29
3.2. Transplante de Microbiota Fecal (TMF)	31
3.3. Indução de disbiose entérica em animais adultos por meio de TMF de fezes provenientes de animais submetidos ao ECV	32
3.4. Indução de disbiose entérica em fêmeas gestantes provocada pelo TMF de fezes provenientes de animais submetidos ao ECV	33
3.5. Indução de disbiose entérica de animais neonatos durante a amamentação provocada pelo TMF de fezes provenientes de animais submetidos ao ECV.....	34
3.6. Testes comportamentais.....	35
3.6.1. Teste de inibição à alimentação induzido pela novidade (IAIN)	35
3.6.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	35
3.6.3. Suspensão pela Cauda (SC)	36
3.6.4. Spray de Sacarose (SS).....	36
3.7. Análise de expressão gênica.....	36
3.8. Caracterização da microbiota das amostras de fezes	39
3.9. Análises estatísticas.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Efeitos do protocolo de ECV nos animais doadores da microbiota	42
4.2. Efeitos comportamentais e de expressão gênica da disbiose entérica em animais adultos	45
4.3. Efeitos da disbiose entérica gestacional materna sobre o padrão comportamental e expressão gênica na prole, avaliados com 21 e 55 dias.....	47

4.4. Efeitos da disbiose entérica em animais neonatos durante a amamentação sobre o padrão comportamental e expressão gênica na prole, avaliados com 21 e 55 dias.....	51
4.5. Efeitos do estresse e do TMF na diversidade da microbiota fecal	53
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Teoria do Holobionte: um breve retrospecto sobre o estudo da microbiota humana

Os microrganismos são considerados como a primeira forma de vida do nosso planeta¹ e, após mais de 3.8 bilhões de anos de evolução, ocupam os mais diversos ambientes, podendo ser encontrados até mesmo habitando em plantas e animais, como os seres humanos². Comunidades microbianas existem em toda a superfície do hospedeiro humano³, de forma que cada local do corpo apresenta uma ecologia única⁴. Elas são formadas por bactérias, fungos, vírus, archeas e protozoários⁴, mas numericamente são dominadas pelas bactérias⁵, que consequentemente ganharam mais atenção dos pesquisadores nas últimas décadas⁶.

Estima-se que para cada célula humana haja, pelo menos, uma célula bacteriana habitando no corpo do hospedeiro⁷. Somente no intestino vivem, em média, 100 espécies de bactérias distribuídas em mais de 8000 cepas⁸, que em conjunto expressam de 2 a 20 milhões de genes, enquanto o corpo humano expressa de 20 a 25 mil, de forma que o microbioma expressa cerca de 100 vezes mais genes corpo humano em si⁹. Esses microrganismos coevoluíram com os nossos ancestrais, atuando de forma dinâmica em seus corpos ao longo de cada estágio da vida, da gestação e nascimento à morte e decomposição⁴. Essa coevolução moldou os fenótipos dos hospedeiros e de sua microbiota associada, criando a necessidade de estudá-los como uma unidade evolutiva, conhecida como organismo holobionte¹⁰, que integra relações genéticas e metabólicas para melhor se adaptar ao meio.

A influência microbiota sobre os diferentes sistemas regulatórios do hospedeiro, como o sistema imune¹¹, endócrino¹² e nervoso¹³, impacta diferentes processos fisiológicos e patológicos, como o envelhecimento¹⁴, a carcinogênese¹⁵, processos autoimunes¹⁶ e, inclusive, o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos¹⁷. Um modelo animal que evidencia a importância da microbiota para a saúde do hospedeiro são os animais *Germ-Free* (GF; livres de germes). Estes animais apresentam, entre outros problemas, deficiências na função imune

e respostas inflamatórias¹⁸ e metabólicas¹⁹, assim como na integridade da barreira hematoencefálica²⁰, comunicação sináptica²¹, neurogênese²² e angiogênese²³, e prejuízos comportamentais relacionados à resposta ao estresse²⁴, cognição²¹ e sociabilidade¹⁹.

Em humanos, os primeiros registros sobre o uso terapêutico da microbiota datam do século 4, na China²⁵. Apesar dos microrganismos serem desconhecidos pelas pessoas, eles já eram utilizados nas “Yellow Soup”, soluções feitas a partir das fezes de pessoas saudáveis que eram utilizadas como tratamento para envenenamento e quadros de diarreia, que durou por séculos²⁵. Já na Europa, os primeiros registros do uso terapêutico da microbiota em humanos foram feitos nos séculos 18, 19 e da Segunda Guerra Mundial, onde bactérias do trato gastrointestinal eram administradas em soldados alemães sofrendo de disenteria nas campanhas pelo Norte da África^{25,26}.

Contudo, somente nos últimos 20 anos os estudos sobre a microbiota ganharam notoriedade, com um crescimento exponencial²⁷. Esse aumento recente nas pesquisas sobre o tema pode ser explicado pelas evoluções nas ferramentas de sequenciamento e caracterização metagenômica²⁸, que reduziram os custos nas análises e permitiram que a caracterização microbiológica, antes feita a partir do cultivo em meio de cultura, fosse feita mais rápida e em maiores escalas. Essas inovações foram fundamentais em particular para o estudo da microbiota entérica, que por ser composta majoritariamente por microrganismos anaeróbicos²⁹ e pela carência de meios comerciais³⁰, foi por muito tempo considerada incultivável³¹ e, ainda hoje, apresenta limitações^{30,31}.

Por outro lado, além das evoluções tecnológicas comentadas, as mudanças drásticas do ambiente humano no que tange saúde e saneamento também contribuíram com o aumento das pesquisas na área³². Diferentes inovações médicas e de saúde pública nos últimos 300 anos permitiram que a humanidade deixasse de apresentar sociedades de duas gerações e passasse a conviver com quatro ou mais gerações em uma mesma família³³, como a descoberta dos microrganismos³⁴, o desenvolvimento da teoria microbiana das doenças³⁴, o desenvolvimento de técnicas de vacinação³⁴, esterilização e saneamento³⁵, e a descoberta e uso em escala industrial de antibióticos³⁶. Contudo, com essas inovações acompanhamos o avanço dos males do século XXI: de casos de alergias³⁷, asma³⁸, diabetes³⁹ e obesidade⁴⁰ a transtornos neuropsiquiátricos¹⁷. Estamos presenciando o aumento do número de doenças

que potencialmente estão ligadas à disbiose^{17,37-40}, como ficaram conhecidos quadros de desequilíbrio da microbiota intestinal^{41,42}.

1.2. Comunicação entre cérebro e intestino

1.2.1. Nervos e neurotransmissores

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) contém neurônios localizados no sistema nervoso central (SNC) e periférico, sendo composto de 3 divisões: simpática, parassimpática e entérica⁴³. O termo autonomia vem do grego para “independente”, uma vez que a muitas vezes as funções do SNA são executadas sem controle voluntário consciente⁴⁴. Funções chave do trato gastrointestinal, como permeabilidade e motilidade, secreção de bile, produção de bicarbonato e muco, e a resposta imune da mucosa são todas controladas pelo SNA⁴⁵. Por outro lado, aferências desse sistema também encaminham informações das vísceras para serem processadas no SNC⁴⁶.

A atividade autonômica do trato gastrointestinal é regulada tanto por aferências do SNC quanto por aferências do próprio intestino, capazes de serem moduladas pela microbiota⁴⁷. Por exemplo, já foi demonstrado em camundongos que metabólitos produzidos pela bactéria *Campylobacter jejuni* podem interagir com sinapses do SNA provocando uma ativação do nervo vago e resultando na ativação direta do marcador de atividade neuronal c-Fos nos gânglios sensoriais vagais e no núcleo do trato solitário, que atua como núcleo de retransmissão sensorial primário para o nervo Vago⁴⁸. Esse nervo é o principal componente do Sistema Nervoso Parassimpático e estabelece uma conexão entre o cérebro e o trato gastrointestinal, enviando informações das vísceras ao encéfalo por meio de suas aferências⁴⁹.

Recentemente, Sgritta e associados⁵⁰ foram além em sua pesquisa sobre a comunicação vagal entre o encéfalo e a microbiota. O grupo demonstrou que o tratamento com

Lactobacillus reuteri reverte prejuízos sociais em modelos animais de Transtorno do Espectro Autista (TEA) de forma dependente do nervo Vago, induzindo plasticidade sináptica na Área Tegmentar Ventral (ATV) de camundongos. Nesse modelo, animais vagotomizados não apresentaram melhoras com o tratamento com *L. reuteri*.

Sob condições normais, o nervo Vago projeta fibras para o Núcleo Paraventricular e estimula a liberação de ocitocina para neurônios dopaminérgicos da ATV. No modelo proposto por Sgritta, o tratamento com *L. reuteri* também não gerava efeito em animais que não apresentavam receptores para ocitocina nos neurônios dopaminérgicos da ATV. Dessa forma, fica evidente o papel da microbiota gastrointestinal na modulação do sistema ocitocina-dopamina na ATV, fundamental para a regulação de comportamentos sociais e direcionados a objetivos e recompensas⁵¹ e para a neurobiologia da anedonia^{52,53}. Esses resultados corroboram com os dados de Yang e colaboradores, publicados em 2019, que demonstraram que o transplante fecal de ratos que apresentam comportamento anedônico para ratos saudáveis provoca o mesmo tipo de comportamento nos receptores, de forma dependente da microbiota⁵⁴, e com o trabalho de Zhao e associados, que demonstraram os efeitos antidepressivos e a diminuição do comportamento tipo anedônico em camundongos tratados com probiótico *Lactobacillus plantarum*⁵⁵.

Evidências recentes também demonstram que a microbiota influencia o desenvolvimento do Sistema Nervoso Entérico (SNE) durante períodos críticos do desenvolvimento⁵⁶. O SNE é uma das divisões do SNA⁵⁷ que contém mais neurônios do que a medula espinhal⁵⁸ e seu desenvolvimento ocorre primariamente da embriogênese, mas continua no período pós-natal com a proliferação de células progenitoras e a diferenciação de neurônios para a formação de circuitarias neuronais⁵⁹. Anormalidades no SNE são relacionadas a doenças intestinais como a Doença de Chron⁶⁰ e em distúrbios do SNC, incluindo TEA, Alzheimer (AZ) e Parkinson(PA)⁶⁰. As principais formas de interação entre a microbiota e o SNE durante o desenvolvimento ocorrem através de Receptores de Reconhecimento de Padrões, incluindo os Toll-like Receptores (TLRs), em particular o TLR2 e TLR4, que são receptores presentes nas células imunes do hospedeiro que atuam reconhecendo estruturas microbianas e gerando sinais intracelulares geralmente relacionados com a ativação imune^{61,62}.

A microbiota humana também compartilha uma linguagem neuroquímica com seu hospedeiro⁵⁶ que começou a ser decifrada na década de 1990, quando foi demonstrado que

bactérias respondem a moléculas neuroendócrinas humanas como epinefrina e noraepinefrina^{63,64}. Hoje já existem diversas evidências das interações dos microrganismos com o hospedeiro e seu SNC mediadas por neurotransmissores⁶⁵. Boa parte desses neurotransmissores é sintetizada no trato gastrointestinal e têm sua biossíntese influenciada pela microbiota, como, por exemplo, 90% da serotonina do corpo, que exerce papel fundamental tanto na patogênese de transtornos neuropsiquiátricos quanto em doenças intestinais como a Síndrome do Intestino Irritável^{66,67}. Além de influenciar a biossíntese desse neurotransmissor pelas células Enterocromafins, diversas bactérias como *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia spp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Klebsiella pneumonia*, e *Morganella morganii* também são capazes de produzir serotonina⁶⁵. Além da serotonina, 50% da biossíntese da dopamina do corpo⁶⁸ é realizada por neurônios e células epiteliais do trato gastrointestinal de forma influenciada pela composição da microbiota, onde bactérias como *Lactobacillus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Morganella* e *Klebsiella* também produzem e respondem a norepinefrina, GABA e outros neurotransmissores⁵⁶.

1.2.2. Sistema Imune

Durante a gravidez o feto não apresenta um microbioma bem estabelecido¹¹. No nascimento a situação muda conforme as superfícies e mucosas do corpo, incluindo o trato gastrointestinal, são progressivamente colonizadas por microrganismos, expondo diretamente o sistema imunológico neonatal imaturo a potenciais patógenos⁴. Contudo, sabe-se que animais GF apresentam baixas concentrações de imunoglobulinas, linfopenia, *pools* de leucócitos reduzidos na medula óssea e funções alteradas na resposta imune inata e adaptativa^{69,70}, deixando claro que a microbiota no período neonatal é fundamental para o treinamento do Sistema Imune⁷¹.

De fato, o Sistema Imune é uma importante via de comunicação entre as partes do eixo CIM. Animais GF apresentam redução em número e tamanho das Placas de Peyer presentes no Intestino Delgado⁴¹. Essas placas são agregados de nódulos linfáticos que compõe o Tecido Linfático Associado ao Intestino (GALT) e possuem a capacidade de transportar antígenos e

bactérias luminais, sendo consideradas os sensores imunológicos do intestino⁷². Em humanos com a microbiota saudável, a apresentação dos microrganismos para o Sistema Imune através das Placas de Peyer leva à produção de IgA por linfócitos B maduros⁷³ e à diferenciação de linfócitos T naive em Th2 e Treg⁷⁴, responsáveis por um perfil anti-inflamatório na mucosa intestinal⁷⁴, que está relacionado a uma maior plasticidade e densidade sináptica encefálica, assim como a funções regulatórias na micróglia^{75,76}.

Associado a estes mecanismos, tem sido mostrado que em pacientes com TEA, que apresentam alterações na composição da microbiota intestinal, a disbiose provoca uma maior produção de IgG, relacionada com processos autoimunes⁷⁴, ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos^{74,75} e à diferenciação de linfócitos T naive em linfócitos Th1 e Th17, que provocam uma resposta pró-inflamatória na mucosa intestinal⁷⁴. Essa resposta está relacionada a uma sinaptogênese anormal, menor densidade sináptica e ativação da microglia no encéfalo dos pacientes⁷⁵, gerando neuroinflamação e agravando a progressão da TEA^{75,76}.

Em 2016, Agüero e associados contribuíram de forma significativa ao conhecimento sobre a maturação do Sistema Imune através da microbiota com o achado de que a microbiota materna durante a gestação já influencia o desenvolvimento da resposta imune inata da prole¹¹. Eles colonizaram fêmeas GF com uma cepa modificada de *Escherichia coli* HA107 durante a gestação que só permanecia no intestino por poucos dias, após os quais as fêmeas voltavam ao *status* GF e seus filhotes nasciam sem qualquer contato com microrganismos. Em comparação aos filhotes nascidos de uma gravidez inteiramente GF, os filhotes de fêmeas que sofreram essa colonização transiente apresentaram aumento nas populações intestinais de células linfóides mononucleares, assim como um aumento na expressão intestinal de genes que codificam peptídeos antibacterianos epiteliais. Por fim, também evitavam mais facilmente o desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais em resposta à moléculas microbianas. Essas evidências indicam que, apesar do período neonatal de fato ser uma janela importante para a maturação do Sistema Imune, esse processo já começa durante a gestação sendo modulado pela microbiota materna.

Em relação ao treinamento e aperfeiçoamento do Sistema Imune Adaptativo através da microbiota intestinal, atualmente sabe-se, entre outras coisas⁷¹, que bactérias do gênero *Clostridia* e da espécie *Bifidobacterium bifidum* atuam tanto em animais neonatos quanto em adultos aumentando a população de Linfócitos Treg⁷⁷⁻⁷⁹. Também já foi demonstrado que

probióticos contendo bactérias filamentosas induzem a diferenciação de linfócitos Th17 em camundongos adultos⁸⁰, que peptidoglicanos de bactérias gram-negativa induzem o recrutamento de linfócitos B *naïve* para o intestino para que amadureçam⁸¹, e que em neonatos promovem o aumento da concentração plasmática de IgA em detrimento de IgE⁸².

O trato gastrointestinal é o maior órgão linfoide do corpo em número de células linfóides⁵⁶ e está em constante comunicação com os trilhões de microrganismos que habitam nele. Uma das principais funções da camada epitelial do intestino é limitar o contato da microbiota com os tecidos viscerais^{56,72}, e ela faz isso a partir da secreção de um muco protetor, onde ocorre a maioria das interações entre microbiota e hospedeiro^{72,83}. É fundamental que o Sistema Imune saiba identificar potenciais organismos patogênicos, mas, ao mesmo tempo, diferenciá-los da microbiota saudável do hospedeiro⁸³.

1.2.3. Vias endócrinas e metabólicas

Além das vias nervosas e imunes, a microbiota e o SNC do hospedeiro podem se comunicar através de hormônios e metabólitos liberados na corrente sanguínea¹². O cortisol liberado a partir da ativação do eixo HPA, por exemplo, atua acelerando a motilidade gástrica⁶⁰, prejudicando a adesão de microrganismos com menor capacidade de aderência à mucosa e influenciando o perfil da microbiota⁸⁴. Por outro lado, Messaoudi e associados mostraram com um estudo clínico duplo-cego, paralelo e controlado por placebo que o tratamento com *Lactobacillus helveticus R0052* e *Bifidobacterium longum R0175* em pacientes saudáveis reduziu a presença de cortisol na urina dos pacientes⁸⁵. Esse resultado, junto dos que serão discutidos no tópico 1.4 mostram que o eixo HPA, capaz de modular o perfil da microbiota intestinal⁸⁴, também sofre influência da mesma⁸⁵.

As bactérias intestinais também são capazes produzir moléculas que mimetizam ou interferem com peptídeos e hormônios reguladores do apetite humano, como a Grelina, GLP-1 e PYY⁸⁶⁻⁸⁸. Bäcked e colaboradores demonstraram em 2004 que animais GF são menos propensos a desenvolverem obesidade decorrente de uma alimentação rica em gordura⁸⁹.

Eles apresentam um menor percentual de gordura corporal e, quando colonizados com a microbiota de animais saudáveis, apresentam ganho de 60% na gordura corporal, sugerindo uma relação entre a microbiota e a obesidade. Desde então, outros estudos já demonstraram que a transferência de microbiota para animais GF proveniente de animais obesos ou abaixo do peso provoca o mesmo perfil nos animais receptores¹². Isso sugere que a microbiota intestinal pode influenciar não apenas o metabolismo do seu hospedeiro como também a ingestão de alimentos e a regulação do apetite.

Outras moléculas produzidas pela microbiota intestinal, como os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs), podem atravessar as barreiras gastrointestinal e hematoencefálica, atuando no SNC do hospedeiro⁹⁰. Schroeder e colaboradores demonstraram em 2007 o efeito antidepressivo do Butirato de Sódio no cérebro de roedores⁹¹. O butirato é um AGCC que, quando administrado de forma sistêmica pelo grupo, induziu uma acetilação transitória de curta duração nas histonas do córtex pré-frontal e hipocampo com consequentes mudanças na expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e uma redução do comportamento tipo depressivo dos roedores. Isso porque, além de moléculas sinalizadoras, os AGCCs são inibidores da histona deacetilase⁹², sendo importantes reguladores da expressão gênica.

No intestino, a produção diária de AGCCs depende da ingestão dietética de fibras e da composição da microbiota^{90,93} e eles servem de fonte de energia para as células epiteliais⁹³, regulam a integridade do epitélio⁹⁴, regulam os níveis de mucina e influenciam a motilidade gástrica⁹⁴. Sistemicamente, os AGCCs atuam na regulação da pressão sanguínea⁹⁵, do ritmo circadiano⁹⁶, e dos sistemas Imune e Nervoso⁹⁷. Desse modo, queda nos níveis de AGCCs têm sido reportadas em diversas doenças neuropsiquiátricas, incluindo anorexia⁹⁸, PA⁹⁹, AZ¹⁰⁰, TEA¹⁰¹, Ansiedade¹⁰² e depressão¹⁰³. Diversos prebióticos, como a Inulina e Frutoligosacarídeos, são fibras que quando fermentadas pela microbiota intestinal, levam a produção de AGCCs¹⁰⁴.

Considerando a capacidade de influenciar a função de órgãos e sistemas distais, em muitos aspectos a microbiota intestinal se assemelha a um órgão endócrino⁸⁵. Com isso, atualmente sabe-se que existem diversas possíveis vias de comunicação entre o cérebro e o intestino, desde vias neuronais intrinsecamente inervadas e altamente modificáveis a vias imunes e

endócrinas repletas de cascatas de sinalização e mecanismos de feedback finamente regulados, que podem agir de forma sinérgica ou antagônica¹⁰⁵ (Figura 1).

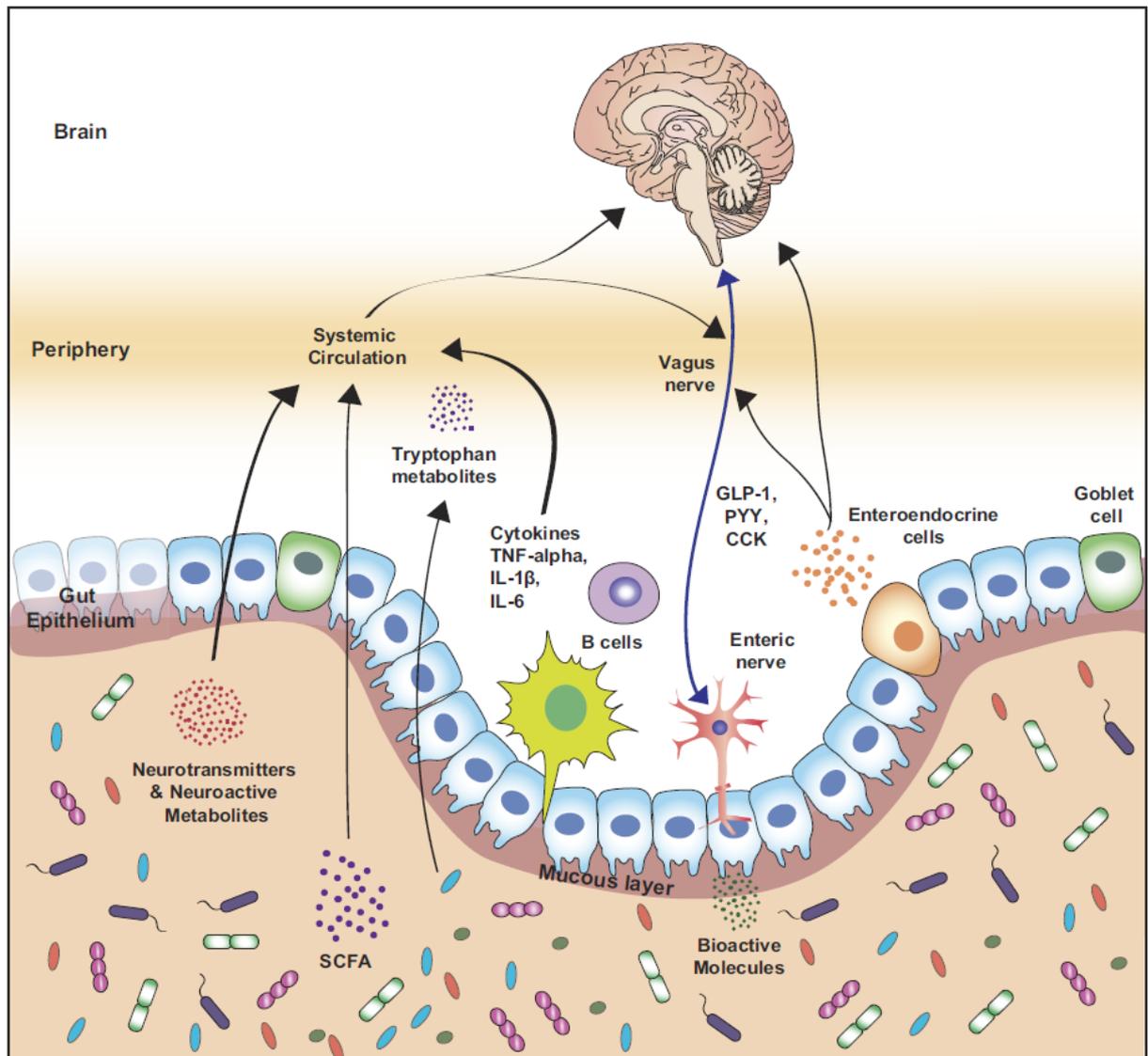


Figura 1: O eixo CIM. Fonte: Cryan e colaboradores⁵⁶. Esquema descrevendo as várias vias bidirecionais conhecidas de comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro, incluindo respostas imunomoduladoras, inervação neuronal, sinalização enteroendócrina e de metabólitos microbianos. CCK: colecistocinina. GLP-1: peptídeo-1 semelhante a glucagon. IL: interleucina. PYY: peptídeo YY. TNF: fator de necrose tumoral. SCFA: ácido graxo de cadeia curta.

1.3. A microbiota materna e o neurodesenvolvimento

A forte comunicação entre a microbiota e o SNC estudada nas últimas décadas¹⁷ e a grande influência do meio no neurodesenvolvimento¹⁰⁶ fizeram surgir um recente interesse sobre a influência da microbiota materna sobre a colonização e maturação da microbiota dos filhos e seu neurodesenvolvimento¹⁰⁶. Um importante estudo conduzido por Drell e colaboradores¹⁰⁷ já demonstrou uma grande plasticidade do perfil da microbiota neonatal frente a alterações na microbiota materna, apresentando mudanças no perfil dos microrganismos que são causadas desde o tipo de parto (natural ou cesárea) até devido ao perfil de microrganismos presentes na aréola mamária da mãe e em sua cavidade oral. Crianças nascidas de parto normal têm contato com a microbiota vaginal da mãe, o que leva à colonização do intestino por bactérias da microbiota vaginal, como *Lactobacillus* e *Prevotella*, enquanto crianças nascidas de cesárea não têm essa exposição direcional à microbiota da mãe, sendo colonizados majoritariamente por bactérias da pele da mãe, da equipe do hospital e do ambiente hospitalar⁶. Essa diferença da composição das bactérias decorrente do tipo de parto diminui ao longo do primeiro ano de desenvolvimento da criança¹⁰⁸, contudo, estudos recentes mostram que a microbiota materna pode estar associada ao aumento do risco de a criança desenvolver asma³⁸, alergia³⁷, diabetes tipo 1³⁹ e com maiores incidências de obesidade⁴⁰.

Jing Lu e associados foram além e demonstraram que os microrganismos residentes no intestino de bebês prematuros que apresentam desenvolvimento lento, o que está relacionado à déficits no neurodesenvolvimento¹⁰⁹, são capazes de causar o mesmo fenótipo em animais GF colonizados com essa microbiota, com a presença de marcadores neuroinflamatórios e prejuízo no desenvolvimento de neurônios e oligodendrócitos, com maior atividade glutamatérgica no encéfalo e menor atividade dopaminérgica e serotoninérgica nesses animais¹¹⁰. Por outro lado, a microbiota de bebês prematuros com desenvolvimento rápido não causou esses prejuízos nos camundongos que tiveram a microbiota humanizada, sendo associada a uma queda dos níveis dos marcadores inflamatórios^{109,110}.

Esse achado está de acordo com a Hipótese das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD; do inglês Developmental Origins of Health and Disease), que propõe que os primeiros mil dias de vida compõe uma janela crítica para o crescimento e desenvolvimento, sendo particularmente sensíveis a estímulos ambientais¹¹¹. Isso porque vias de comunicação que sustentam as capacidades regulatórias do organismo, como vias metabólicas, endócrinas, neurais e imunes, estão sendo moldadas e são altamente influenciadas pelos pais e ambiente que circunda a criança antes mesmo do nascimento¹¹¹. Juntas, elas podem modular o desenvolvimento dos filhos, de maneira a garantir uma vida saudável ou aumentar o risco de doenças futuras¹¹².

Em relação aos transtornos mentais, estudos clínicos e pré-clínicos já demonstraram que a saúde mental materna antes e durante a gravidez, assim como o estresse pré-natal e os hormônios do estresse liberados pela mãe durante o neurodesenvolvimento da prole, estão associados à saúde mental dos filhos em gerações subsequentes, sendo relacionados à problemas no neurodesenvolvimento e alterações comportamentais, além de queixas gastrointestinais na prole^{113,114}, onde pode inclusive alterar o perfil inflamatório do intestino e assim influenciar as bactérias que poderão se desenvolver no trato gastrointestinal dos filhos após o nascimento¹⁰⁷. A microbiota, como um importante fator no desenvolvimento dos sistemas regulatórios do hospedeiro³², também tem sido caracterizada como um ponto fundamental para o desenvolvimento do SNC^{24,114}, de forma uma metanálise recente publicada pelo nosso grupo (Anexo A)¹¹⁵ demonstrou que alterações na microbiota materna durante o período gestacional provocam prejuízos comportamentais na prole, em particular no que tange o comportamento social e estereotipado.

Os achados sobre o papel da microbiota sobre as funções mais complexas do encéfalo chamaram a atenção para a participação na saúde mental da criança já nos primeiros anos de vida. Neste sentido, foi visto que em crianças de 2 a 12 anos, a riqueza e qualidade da microbiota entérica têm grande influência sobre a expressão do comportamento social¹¹⁶. Por exemplo, um estudo conduzido por Kang e colaboradores⁷⁶ analisou a microbiota intestinal de 40 crianças submetidas a 4 diferentes escalas de diagnóstico para identificação do TEA. O trabalho demonstrou que gêneros de bactérias como *Coprococcus* (do filo *Fimicutes*) e *Prevotella* (do filo *Bacteroidetes*) são observados em abundância em crianças neurotípicas, ou seja, aquelas que não manifestam problemas de desenvolvimento neurológico. Porém, esses

gêneros encontram-se reduzidos em crianças que manifestam TEA. Esta relação também foi descrita para o gênero *Bacteroides*, outro representante do filo *Bacteroidetes*. Estudos observacionais sugerem que crianças com maior riqueza deste grupo desenvolvem melhor a linguagem expressiva e são mais receptivas quando observadas aos 2 anos de idade.

Em relação à disbiose no período gestacional, Vuong e colaboradores¹³ demonstraram recentemente em animais que o tratamento com grandes doses de antibióticos em fêmeas durante a gestação mimetiza fenótipos de animais GF, como a redução do tamanho do ceco, e altera a expressão de 333 genes no encéfalo dos embriões. Entre esses genes está o Netrin G1 (NTNG1), que codifica a proteína Netrin-G1a, expressa em axônios talamocorticais em desenvolvimento. Como consequência, os embriões apresentavam menor volume axonal nos axônios talamocorticais em E14.5 e prejuízos táteis identificados pelo teste de Von Frey quando testados após o desmame.

Em humanos, um amplo trabalho conduzido em Shangai acompanhou a gravidez de 410 mães e registrou, através de questionários, quais delas apresentaram sintomas de depressão e ansiedade antes e durante a gravidez¹¹⁷. De forma condizente com a literatura, os filhos de mães que apresentavam esses sintomas possuíam maior incidências desses transtornos, e a análise do mecônio destas crianças, as primeiras fezes, mostrou que a primeira microbiota dos filhos de mães que manifestaram os sintomas psiquiátricos apresentou uma população predominante de bactérias do filo Proteobacteria. Já nos filhos gerados em uma gravidez sem relatos de depressão ou ansiedade predominava o filo *Actinobacteria*, sugerindo que a saúde mental materna pode influenciar o perfil da microbiota gestacional¹¹³, contribuindo para o perfil de microrganismos que irá formar a primeira microbiota do bebê, com possíveis efeitos para a saúde mental da criança em seus primeiros meses de vida.

Além disso, já foi correlacionada a menor diversidade bacteriana do trato gastrointestinal materno durante o terceiro trimestre gestacional com um maior comportamento internalizante dos filhos até dois anos após o parto¹¹⁶. Esse comportamento é caracterizado pela dificuldade de se expressar ou demonstrar suas questões, bem como por apresentar pouco interesse em estabelecer interações sociais. Crianças que apresentam esses comportamentos muitas vezes são descritas como tímidas, introspectivas e com baixa autoestima. E o quadro internalizante é relacionado com o desenvolvimento transtornos de ansiedade e depressão¹¹⁸. Já os filhos de mães que possuíam uma microbiota intestinal

mais diversa apresentavam comportamento dito normativo aos 2 anos, ou seja, sem alterações relacionadas a transtornos mentais¹¹⁶. Além de evidenciar a importância da composição da microbiota intestinal materna no desenvolvimento dos filhos, esse trabalho evidencia a importância do momento em que a exposição a alterações da microbiota materna durante a gestação ocorre para ocasionar consequências no neurodesenvolvimento.

1.4. O estresse e a disbiose impactam o neurodesenvolvimento e a saúde mental

O conceito de estresse foi originalmente utilizado na física para descrever eventos que podem produzir desgastes e deformações¹¹⁹. Na década de 1930, Hans Selye definiu biologicamente o estresse como uma ameaça real ou potencial à homeostase, imposta por diferentes estímulos nocivos que poderiam levar a várias alterações fisiológicas e, eventualmente, à morte^{119,120}. Selye também contribuiu para a popularização do termo estresse em seus livros “Estresse: a tensão da vida” e “Estresse sem sofrimento”¹¹⁹. Já na década de 1960, Paul Meeth postulou, do ponto de vista clínico, que os traços genéticos interagem com o ambiente para produzir distúrbios como depressão, ansiedade ou EZ, o modelo de diátese-estresse¹²¹.

De fato, nos últimos sessenta anos a literatura discutiu a relação entre estresse, características genéticas e a suscetibilidade a transtornos psiquiátricos^{122,123}. Por exemplo, o risco relativo do início dos sintomas do Transtorno Depressivo Maior (TDM) pode ser até cinco vezes maior no mês em que ocorre um evento estressante na vida do paciente¹²⁴. Além disso, não apenas pacientes com Transtorno Bipolar (TB) também relatam mais exposições a eventos estressantes antes de recaídas¹²⁵, como também já foram realizadas correlações entre eventos estressantes e o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), o comportamento suicida e a EZ¹²⁶⁻¹²⁸.

Após décadas de estudos sobre a influência do estresse na etiologia de diferentes transtornos neuropsiquiátricos, um trabalho relevante realizado por Sudo e colaboradores em

2004, demonstrou que camundongos GF apresentavam maior liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, importantes na regulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e diretamente relacionados à resposta ao estresse, frente a duas horas do estresse de restrição, quando comparados a camundongos com microbiota saudável²⁴. Essa resposta exagerada do eixo HPA em animais GF era revertida se os camundongos tivessem a microbiota intestinal reconstituída com as fezes de animais controle *Specific Pathogen Free* (SPA; livres de patógenos) em fases juvenis, mas não quando adultos. Esse resultado embasou uma série de estudos presentes na literatura que demonstram o papel da microbiota gastrointestinal na regulação e desenvolvimento dos sistemas de resposta ao estresse¹²⁹⁻¹³¹. Em 2021, Karen e associados foram além e demonstraram que a suplementação com *Lactobacillus paracasei* nos filhotes em um modelo de estresse por separação materna em ratos foi capaz de atenuar os efeitos do estresse no comportamento tipo ansioso dos filhotes, acompanhado de uma redução nos níveis de ACTH e Corticosterona¹³². Tais resultados indicam que a exposição à microrganismos em fases iniciais do desenvolvimento é necessária para que hospedeiro responda melhor à regulação inibitória do eixo HPA.

Dessa forma, a hipótese de que a microbiota intestinal pode regular a resposta ao estresse do hospedeiro abriu portas para diversos trabalhos na última década, que ampliaram estas evidências e indicam que o eixo Cérebro-Intestino-Microbiota (CIM) exerce papel ainda mais relevante na regulação de funções cerebrais, particularmente em processos emocionais, cognitivos, comportamentais e na modulação de respostas ao estresse relacionadas ao eixo HPA^{24,133}. Os trabalhos mostram, por exemplo, que a transferência da microbiota de animais submetidos ao estresse que apresentam prejuízos comportamentais para animais GF é capaz de induzir as mesmas alterações observadas nos animais doadores¹³⁴, além de prejudicar a neurogênese hipocampal, o que está diretamente relacionado aos sintomas do TDM^{120,134,135}.

Esses resultados deixam clara a forte comunicação bidirecional que ocorre entre encéfalo e intestino, uma vez que o estresse ao qual os animais doadores são submetidos é capaz de alterar o perfil de sua microbiota intestinal e a transferência desta para animais receptores é capaz de provocar prejuízos neurológicos e comportamentais similares aos dos doadores. Em humanos, ensaios clínicos randomizados com probióticos reforçam a relação entre a microbiota intestinal e a resposta ao estresse¹³⁶. Por exemplo, a suplementação de

probióticos melhorou o sono, os hábitos alimentares e reduziu os níveis de estresse e cortisol em estudantes de medicina japoneses¹³⁷. Essa comunicação é uma possível explicação do porquê pacientes que apresentam queixas gastrointestinais decorrentes de doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn, apresentam maior incidência de transtornos como a depressão e ansiedade, e pacientes com esses transtornos apresentem mais problemas gastrointestinais¹³⁸.

Desse modo, a literatura tem evidenciado que, em particular para o SNC, a microbiota intestinal atua no neurodesenvolvimento¹³, na modulação da resposta ao estresse²⁴, e está envolvida em doenças neurodegenerativas como AZ e PA¹³⁹, assim como no TEA⁵⁰ e em transtornos de ansiedade¹⁴⁰ e de humor, como o TDM¹⁴¹. Por fim, a complexidade genética do microbioma e o dinamismo das interações entre a microbiota intestinal e o SNC através do eixo CIM talvez compreenda uma das vias de comunicação mais complexas já conhecidas¹⁰⁵.

1.5. Hipótese

As recentes evidências apresentadas deixam clara a importância da microbiota intestinal para o neurodesenvolvimento¹³ e para a modulação de sistemas regulatórios²⁴ com potencial para influenciar o comportamento, e evidenciam possíveis mecanismos pelos quais essa interação ocorre⁵⁶. Contudo, a janela temporal é de suma importância para o desenvolvimento, em particular do sistema nervoso¹⁴², e foi pouco explorada até o momento no que tange as interações do eixo CIM. Dessa forma, a hipótese avaliada no presente trabalho é de que a disbiose em diferentes momentos do desenvolvimento (durante a gestação, amamentação e na vida adulta) irá impactar de diferentes formas o comportamento dos hospedeiros. A fim de explorar essa hipótese os animais serão analisados através de testes comportamentais, avaliando comportamento tipo depressivo e tipo ansioso, além de análises de biologia molecular avaliando a expressão de genes relacionados com a sinaptogênese, oligodendrogênese, diferenciação de interneurônios, pluripotência de

progenitores neurais, e neuroplasticidade. A análise da composição da microbiota dos grupos avaliados também será realizada, através de técnicas de sequenciamento de nova geração.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Tomadas em conjunto as evidências mais recentes, o presente estudo tem como objetivo investigar se a microbiota intestinal, nas diferentes fases do desenvolvimento neural da prole, exerce influência sobre o padrão comportamental e de expressão gênica associados a transtornos de humor e ansiedade na vida adulta.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Investigar se a transferência da microbiota fecal provenientes de camundongos submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Variado (ECV) para animais adultos é capaz de induzir prejuízos comportamentais e alterações na expressão gênica associados à depressão e ansiedade;

2.2.2. Investigar se a transferência de microbiota fecal proveniente de camundongos submetidos ao ECV para neonatos saudáveis, ao longo da amamentação, é capaz de induzir prejuízos comportamentais e alterações na expressão gênica associados à depressão e ansiedade durante a fase juvenil e/ou após a puberdade;

- 2.2.3. Investigar se a transferência da microbiota intestinal proveniente de camundongos submetidos ao protocolo de ECV para camundongos gestantes é capaz de induzir prejuízos comportamentais e alterações na expressão gênica associados à depressão e ansiedade nas proles durante a fase juvenil e/ou após a puberdade;
- 2.2.4. Investigar se os prejuízos neuroestruturais e comportamentais associados aos transtornos de ansiedade e de depressão maior gerados pela exposição à microbiota proveniente de animais submetidos ao ECV estão associados ao perfil microbiológico por meio da análise metagenômica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

- 3.1. Indução de disbiose entérica em animais adultos por meio do protocolo de Estresse Crônico Variado

O protocolo de estresse crônico variado (ECV; Tabela 1), adaptado de Katz e Hersh, 1991¹⁴³ e de Monteiro e colaboradores, 2015¹⁴⁴, consiste em estressores moderados e randômicos aplicados de forma ininterrupta ao longo de 4 semanas. Esse modelo mimetiza em camundongos as alterações comportamentais e fisiológicas observadas em humanos diante do estresse crônico, como a neurogênese hipocampal do adulto prejudicada e a disbiose entérica¹³⁴, garantindo uma boa validade de face¹⁴⁵. Além disso, animais submetidos ao estresse crônico respondem ao tratamento com drogas antidepressivas, que estimulam a neurogênese hipocampal adulta, atenuam as respostas ao estresse e restauram o comportamento normal, o que demonstra a validade preditiva do modelo¹⁴⁵.

O protocolo inclui os seguintes estressores: **nado forçado** - os animais são colocados individualmente em recipientes com aproximadamente 1,5l de água por um tempo de 5

minutos; **caixa inclinada** - os animais são mantidos por uma hora nas caixas de seus respectivos grupos mantidas em um ângulo de 45°, a maravalha é retirada para evitar a formação de um plano na borda da caixa; **ar quente** - os animais são expostos ao ar quente (45-50 °C) de um secador de cabelo individualmente por 5 minutos, tendo ar direcionado para as suas costas, evitando assim o contato com os olhos; **retirada de maravalha** - os animais são deixados ao longo da noite na caixa de seus respectivos grupos sem maravalha; **maravalha molhada** - os animais são deixados ao longo da noite na caixa de seus respectivos grupos com a maravalha molhada ao ponto de pingar quando se aperta um punhado; **privação de comida** - os animais passam a noite na caixa de seus respectivos grupos sem comida (14h de privação); **alternância de ciclo** - ao longo do dia os animais são mantidos em uma sala escura e ao longo da noite em uma sala clara, perturbando assim seus ciclos circadianos.

Após os prejuízos comportamentais induzidos pelo protocolo de ECV serem confirmado pelos testes comportamentais de Inibição da Alimentação Induzida pela Novidade, Labirinto em Cruz Elevado, Suspensão pela Cauda e Spray de Sacarose, os camundongos estressados continuaram sendo submetidos ao ECV diariamente durante o período em que suas fezes foram coletadas para o protocolo de Transplante de Microbiota Fecal (TMF, Figura 2). O objetivo dessa manutenção do CUS foi evitar que os efeitos do estresse fossem atenuados ao longo do tempo, conforme demonstrado anteriormente¹⁴⁶, durante o período do TMF. Os animais não foram estressados nos dias em que os testes comportamentais foram realizados. O grupo controle foi levemente manuseado nos dias de aplicação dos estressores no grupo ECV.

Tabela 1. Calendário mensal do protocolo de Estresse Crônico Variado

	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
1ª SEMANA	Retirada de maravalha	Restrição	Nado forçado	Privação de comida	Caixa inclinada	Restrição
2ª SEMANA	Maravalha molhada	Privação de comida	Ar quente	Alternância de ciclo	Restrição	Caixa inclinada
3ª SEMANA	Privação de comida	Alternância de ciclo	Restrição	Retirada de maravalha	Ar quente	Maravalha molhada
4ª SEMANA	Retirada de maravalha	Restrição	Ar quente	Privação de comida	Nado forçado	Caixa inclinada

3.2. Transplante de Microbiota Fecal (TMF)

Após a confirmação das alterações comportamentais dos animais doadores, suas fezes passaram a ser coletadas para o protocolo de TMF. A gavagem foi utilizada como método de inoculação da microbiota, tanto alterada (proveniente de animais submetidos ao ECV) quanto controle (proveniente de animais controle), nos animais submetidos ao TMF. Para a gavagem dos camundongos adultos e das fêmeas gestantes foi utilizada uma agulha de gavagem da marca Aton, de aço inox, curvada ao ângulo de 9 graus, com cânula de diâmetro de 1,2 mm (distal). Para a gavagem dos neonatos utilizamos pipetas de 20 µl devido ao tamanho dos animais. Foi inoculada uma solução feita a partir das fezes dos animais estressados ou controle diariamente por um período de 14 dias nos animais adultos, durante toda a amamentação a partir do quarto dia após o nascimento dos neonatos e durante toda a gestação das fêmeas. A solução é feita a partir de 3 gramas de fezes frescas, colhidas diariamente logo antes da gavagem, dissolvidas em 20 ml de PBS. Para cada 1 grama do animal adulto inoculamos um volume de 5 µl, enquanto para cada 3 gramas do neonato inoculamos um volume de 5 µl.

Como a microbiota do trato gastrointestinal dos animais adultos já está num estágio de clímax ecológico⁴, podendo dificultar colonização com a microbiota do TMF, os animais adultos (machos e fêmeas) que sofreram a gavagem foram tratados com o antibiótico Baytril injetável 5% (BAYER, Princípio Ativo: Enrofloxacino), através de injeção subcutânea, na dose de 5×10^{-3} mg/Kg, segundo protocolo previamente descrito¹⁴⁷, para desbalancear a microbiota residente e facilitar a colonização pelas bactérias do TMF. Os animais foram tratados por um período de 4 dias, logo antes de começar a gavagem. Os animais neonatos não passaram pelo protocolo de tratamento com antibiótico uma vez que ainda não possuem uma microbiota residente madura.

3.3. Indução de disbiose entérica em animais adultos por meio de TMF de fezes provenientes de animais submetidos ao ECV

Para investigar o efeito da TMF em animais adultos foram utilizados camundongos da linhagem Swiss com 55 dias separados em dois grupos. Um grupo controle recebeu a solução feita a partir de fezes de animais não estressados e o outro grupo recebeu a solução feita a partir de fezes proveniente dos animais submetidos ao ECV. Os animais foram previamente tratados com antibiótico por 3 dias, seguidos por 21 dias de TMF, após os quais os animais foram avaliados nos testes comportamentais, e então eutanasiados para extração de amostras de córtex e hipocampo (Figura 2).

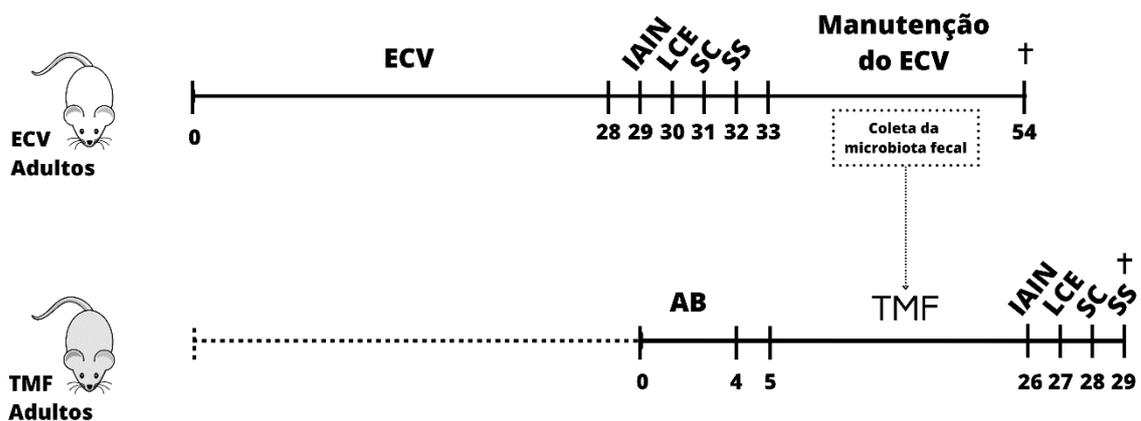


Figura 2: Protocolo de Transferência de Microbiota Fecal para animais adultos. ECV = Estresse Crônico Variado. AB = Antibiótico. TMF = Transplante de Microbiota Fecal. IAIN = Inibição da Alimentação Induzida pela Novidade. LCE = Labirinto em Cruz Elevado. SC = Suspensão pela Cauda. SS = Spray de Sacarose. † = Eutanásia.

3.4. Indução de disbiose entérica em fêmeas gestantes provocada pelo TMF de fezes provenientes de animais submetidos ao ECV

Para investigar os efeitos do TMF durante o período gestacional, 8 camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram postas para acasalar com 4 machos, na proporção de 2 fêmeas para um macho. Todos os animais foram tratados previamente com antibiótico, como descrito anteriormente, e foram postos para acasalar por 3 dias, de forma concomitante com o início do protocolo de gavagem. Um total de 4 fêmeas controle receberam o TMF a partir de uma solução feita das vezes de animais saudáveis não estressados durante toda a gestação, enquanto outras 4 fêmeas sofreram o TMF com uma solução feita a partir das fezes provenientes de animais expostos ao ECV. Ambas as proles foram divididas de forma que metade dos filhotes crescesse por 21 dias até serem avaliados nos testes comportamentais e sofresse eutanásia para análise de expressão gênica cortical e hipocampal, e a outra metade crescesse por 55 dias (Figura 3) para então serem avaliados. Esta abordagem foi escolhida com objetivo de analisar se as alterações presentes na fase pré-puberal (com 21 dias), seriam mantidas após a puberdade (55 dias), em virtude da dinâmica de colonização da microbiota intestinal⁴ e das alterações do Sistema Nervoso Central durante o neurodesenvolvimento que ocorrem da infância à vida adulta¹⁴⁸.

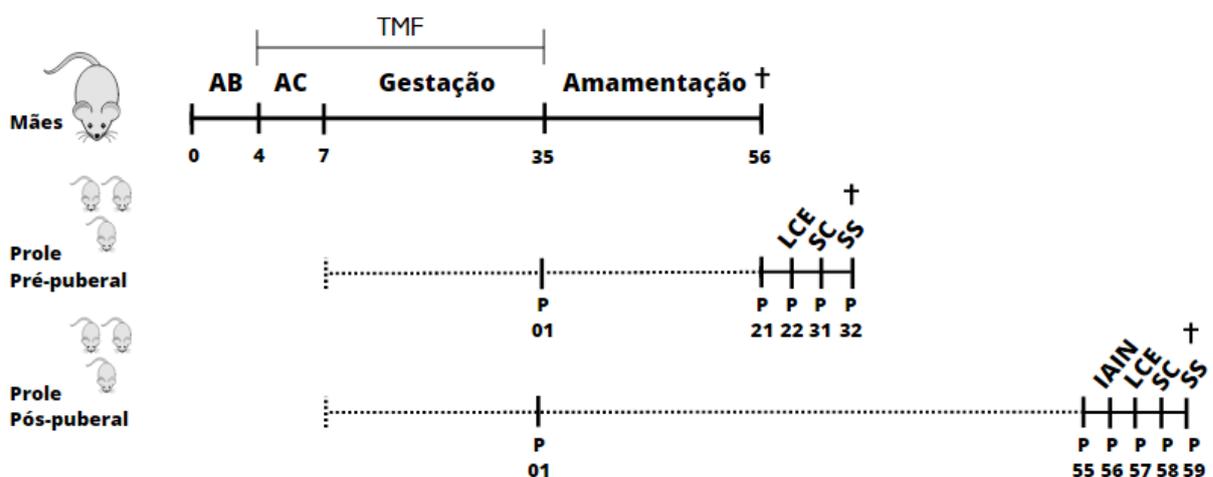


Figura 3: Protocolo de Transferência de Microbiota Fecal para fêmeas gestantes. AB = Antibiótico. AC = Acasalamento. P = Dia Pós-Natal. TMF = Transplante de Microbiota Fecal. IAIN = Inibição da Alimentação Induzida pela Novidade. LCE = Labirinto em Cruz Elevado. SC = Suspensão pela Cauda. SS = Spray de Sacarose. † = Eutanásia.

3.5. Indução de disbiose entérica de animais neonatos durante a amamentação provocada pelo TMF de fezes provenientes de animais submetidos ao ECV

Para o TMF dos animais neonatos, 6 camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram postas para acasalar com 2 machos, na proporção de 3 fêmeas para 1 macho. As fêmeas e seus respectivos filhotes foram divididos aleatoriamente (3 ninhadas por grupo) entre o grupo que sofreu o TMF a partir de uma solução feita das vezes de animais saudáveis não estressados e o grupo submetido ao TMF com uma solução feita a partir das fezes provenientes de animais expostos ao ECV. A gavagem ocorreu durante toda a amamentação a partir do quarto dia de nascimento (P.04), durando um total de 17 dias, após os quais foram submetidos com 21 (p.21) ou 55 (p.55) dias aos testes comportamentais, seguidos pela eutanásia para extração de amostras de córtex e hipocampo (Figura 4). O início da gavagem ocorreu em P.04 por ser o período no qual os camundongos podem passar pelo procedimento com menores riscos de danos aos animais¹⁴⁹.

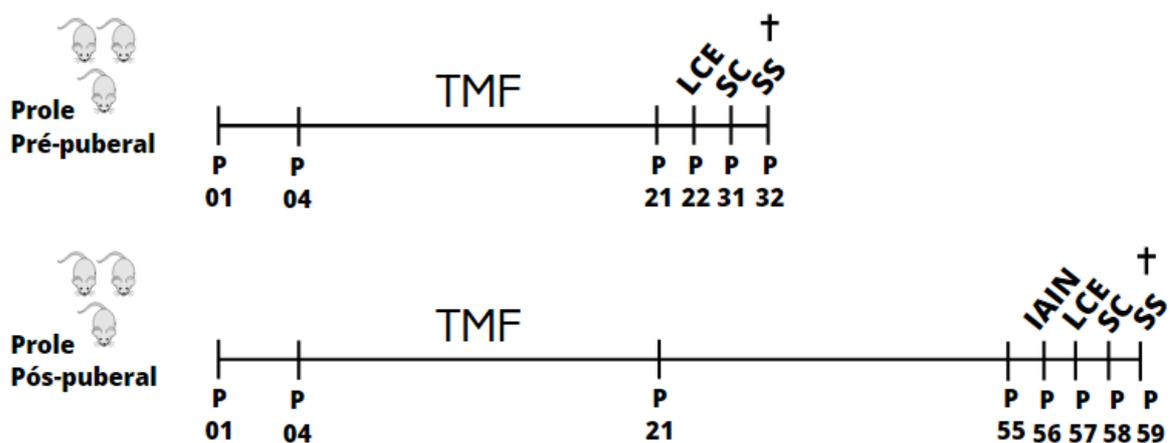


Figura 4: Protocolo Transferência De Microbiota Fecal para camundongos neonatos. P = Dia Pós-Natal. TMF = Transplante de Microbiota Fecal. IAIN = Inibição da Alimentação Induzida pela Novidade. LCE = Labirinto em Cruz Elevado. SC = Suspensão pela Cauda. SS = Spray de Sacarose. † = Eutanásia.

3.6. Testes comportamentais

3.6.1. Teste de inibição à alimentação induzido pela novidade (IAIN)

Este teste explora a aversão natural dos roedores por novos ambientes, analisando comportamento ansioso e anedônico. Os animais são privados de comida ao longo da noite (12h) e então colocados em uma caixa aberta retangular de acrílico (28 x 17 x 13 cm) com comida no centro (Figura 3). A tendência dos animais é passar mais tempo nas bordas da caixa do que no centro para diminuir sua exposição, porém esse teste tem o estímulo da comida. Espera-se que os animais que demonstram comportamento tipo ansioso, tipo depressivo ou tipo anedônico fiquem ainda mais tempo nas bordas da caixa e com isso demorem mais para começar a se alimentar, mesmo com o estímulo da comida, evitando assim a exposição em local aberto. Para analisar este teste conta-se o tempo que o animal leva para ir até a comida e o tempo para começar a comer¹⁵⁰.

3.6.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Este teste explora a aversão natural dos roedores por ambientes abertos. Utiliza-se um aparato de acrílico, elevado a 45 cm do solo com dois braços abertos de 15 cm e dois braços fechados de 15 cm, em formato de cruz. O animal é colocado no centro do aparato virado para um dos braços fechados e a tendência é que eles passem mais tempo nos braços fechados para diminuir sua exposição durante os 5 minutos de teste, porém que também explorem os braços abertos devido ao seu comportamento exploratório. Quando o animal apresenta comportamento tipo ansioso, passa menos tempo nos braços abertos. E realiza mais vezes o comportamento de avaliação de risco (Figura 4), no qual ele se protege nos braços fechados e estica o corpo para colocar a cabeça para fora do aparato com o objetivo de investigar o ambiente, mas não sai de fato para o braço aberto para explorar. Para analisar o teste, contabiliza-se o tempo que o animal ficou nos

braços abertos, o número de comportamentos de avaliação risco e também o número de vezes que o animal cruzou os braços fechados como um controle da mobilidade dos animais, que não deve dar diferença significativa¹⁵¹.

3.6.3. Suspensão pela Cauda (SC)

Este teste explora o tempo de imobilidade do animal frente a uma situação aversiva, analisando assim o comportamento de desamparo. Eles são presos pela cauda por 5 minutos em um suporte elevado (Figura 5) e a tendência é que eles se movimentem para conseguir fugir, enquanto os animais com sinais tipo depressivo ficam imóveis por mais tempo¹⁵².

3.6.4. Spray de Sacarose (SS)

Este teste explora o tempo que os animais demoram para começar a realizar o comportamento de grooming facial (Figura 6), assim como o número de vezes que realizam esse comportamento, após a aplicação de uma solução de Sacarose 10% no dorso deles, com um spray. O teste é realizado em uma caixa transparente de acrílico (20x30x13 cm) e tem duração de 5 minutos. A tendência dos animais saudáveis é de realizarem o Grooming Facial rapidamente para se limpar e, ao perceber o sabor da solução, repetir esse comportamento várias vezes, enquanto os animais com sinais tipo depressivo demoram mais para realizar o primeiro Grooming Facial repetem esse comportamento um menor número de vezes¹⁵³.

3.7. Análise de expressão gênica

A expressão dos genes Sinapsina 1, Fator de Transcrição de Oligodendrócitos 1 (Olig1) e SRY (do inglês: Sex Determining Region Y)-box 2 (Sox2), foi analisada nas amostras de córtex

pré-frontal e de hipocampo coletadas, pois todos são genes que atuam no desenvolvimento, função e manutenção do tecido nervoso e apresentam alterações em pacientes com sintomas depressivos¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. A proteína Sinapsina I atua, em sua forma fosforilada, no ancoramento de vesículas na membrana celular de neurônios pré-sinápticos¹⁵⁷ (Figura 5).

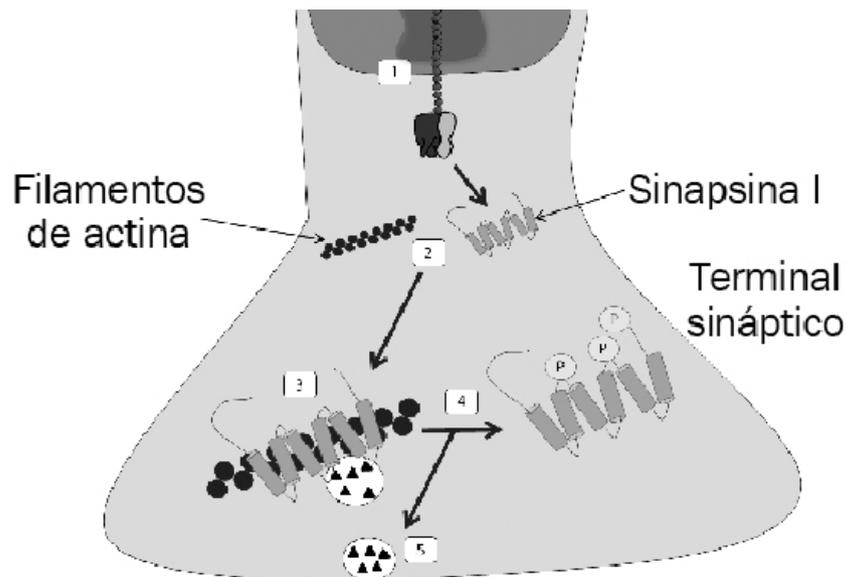


Figura 5: Esquema da atuação da proteína Sinapsina I no terminal pré-sináptico. Fonte: Canova e associados¹⁵⁸. (1) após sua tradução, a proteína Sinapsina I liga-se aos filamentos de actina (2) atuando como proteína de ancoramento das vesículas sinápticas aos filamentos de actina no terminal pré-sináptico (3). Com a fosforilação da proteína Sinapsina I (4), as vesículas são desancoradas e o neurotransmissor pode ser liberado na fenda sináptica (5). FONTE: Canova, Fernando & Ferrari, Elenice. (2015).

O Fator de Transcrição de Oligodendrócitos 1, codificado pelo gene *Olig1*, apresenta duas funções distintas no SNC: ao mesmo tempo que atua junto do gene *Olig2* no processo de diferenciação e mielinização dos oligodendrócitos, células fundamentais para a regulação de sinapses e circuitarias neuronais¹⁵⁹, também atua reprimindo a diferenciação de interneurônios gabaérgicos¹⁶⁰ (Figura 6).

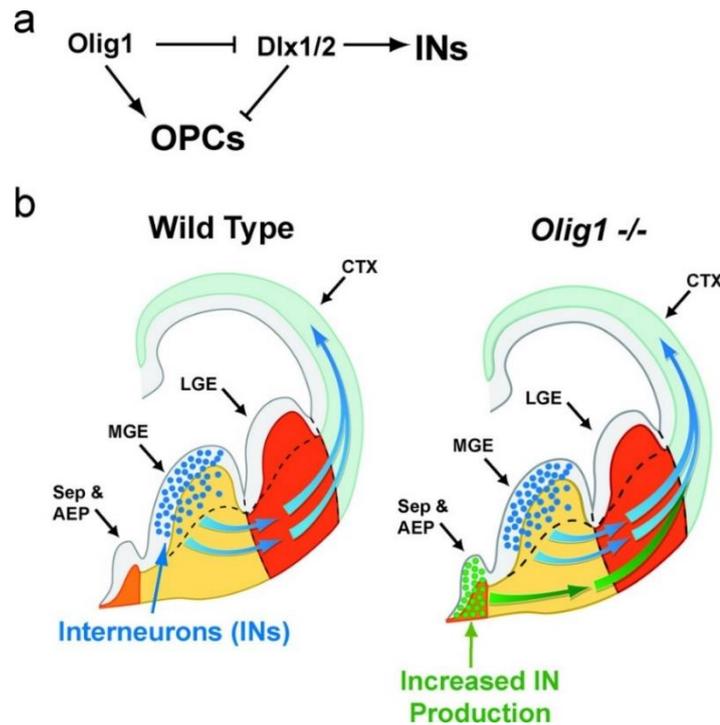


Figura 6: Atuação do Olig 1 na mielinização e na repressão de interneurônios gabaérgicos. Fonte: Silbereis e associados¹⁶⁰. a = demonstraco esquemática da atuao do gene Olig1 na represso da diferenciao dos interneurnios gabaérgicos e na especializao de precursores de oligodendcitos. O Olig 1 inibe o gene Dlx1/2, que é necessrio para a produo de interneurnios e inibe a especializao de precursores de oligodendcitos. b = Olig 1 inibe a produo de interneurnios gabaérgicos do Septo Embrionrio Dorsal (Sep), da rea Enteropeduncular Anterior (AEP) e da Eminncia Ganglionar Ventral Medial (vMGE).

O SRY (do ingls: Sex Determining Region Y)-box 2 é um fator de transcrio pioneiro, codificado pelo gene Sox2, fundamental para manuteno da pluripotncia de clulas tronco e para a neuroplasticidade¹⁶¹, atuando no desenvolvimento e metabolismo do Sistema Nervoso¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

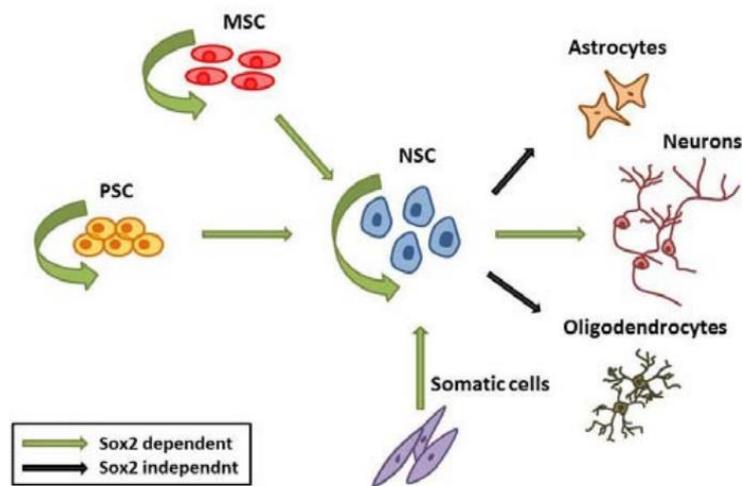


Figura 7: Processos dependentes e independentes de Sox2 no SNC. Fonte: Kretsovali¹⁶⁵. O fator de transcrição Sox2 promove a manutenção da auto-renovação de células tronco embrionárias (PSC), células tronco mesenquimais (MSC) e células tronco neuronais (NSC), além de regular positivamente a diferenciação de MSCs e PSCs em NSC e de NSCs em neurônios.

O RNA foi extraído de amostras de córtex pré-frontal e hipocampo congeladas usando o protocolo de extração por TRizol (Invitrogen). A formação do cDNA foi realizada usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems). Posteriormente, a qRT-PCR foi realizada em um sistema StepOne Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) com Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. O GAPDH foi utilizado como controle endógeno para normalizar os dados de expressão gênica¹⁶⁶.

3.8. Caracterização da microbiota das amostras de fezes

Amostras fecais foram coletadas dos animais doadores e camundongos submetidos ao FMT um dia antes do início dos testes comportamentais. As amostras foram imediatamente armazenadas em etanol 99.9% no freezer -80°C. O DNA das amostras foi isolado usando um sistema de extração comercial (QIamp PowerFecal Pro DNA Kit, QIAGEN) de acordo com o

protocolo do produto. As amostras de DNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria no NanoDrop (INVITROGEN), e a pureza das amostras aferidas a partir das razões de absorvância 260/280 e 230/260.

O preparo de bibliotecas para caracterização da microbiota de amostras de fezes foi realizado conforme protocolo da Illumina¹⁶⁷, com modificações (Figura 8). Primeiro foi realizado uma PCR para amplificação das regiões V3 e V4 do DNA Ribossomal Bacteriano utilizando 2.5 uL do DNA extraído das amostras de fezes na concentração de 5 ng/uL, com as sequências de primers específicos do gene 16s:

V3/V416sF 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

V3/V416sR 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Em seguida, foi feita uma corrida de eletroforese em gel de agarose com o produto da PCR para verificação da integridade da amostra e coleta da região de interesse (aproximadamente 550 pares de base) e o DNA foi extraído do gel utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Após a extração da amostra do gel, ela foi limpa utilizando *beads* magnéticas e uma segunda PCR foi feita para realizar a ligação de índices de reconhecimento nas amostras, conforme protocolo da Illumina. Logo após, foi feita mais uma limpeza com *beads* magnéticas e alíquotas das amostras foram corridas em eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade e do tamanho das amostras (aproximadamente 630 pares de base após a ligação dos índices). Após a confirmação do tamanho das amostras e da ligação dos índices, elas foram diluídas a 4 nM, misturadas em um *pool* contendo todas as amostras a serem sequenciadas. O *pool* foi então desnaturado conforme protocolo da Illumina, diluído a 8 pM e introduzido em uma cartilha de sequenciamento V2 de 500 ciclos da Illumina para sequenciamento na plataforma MiSeq da Illumina. O sequenciamento foi realizado conforme descrito anteriormente⁵⁰, utilizando o protocolo 2x250 pares de base *paired-end*.

A análise do microbioma foi realizada conforme descrita anteriormente (Figura 8)^{50,168}. Em resumo, as sequências obtidas em formato FASTQ foram analisadas por meio do pipeline QIIME 2 versão 2020.2. O controle de qualidade foi realizado nas sequências demultiplexadas usando o pacote RCPP do software DADA2 versão 1.28.0 para filtrar as sequências quiméricas. Posteriormente, ao grupamento e classificação taxonômica foram avaliados usando o banco de dados SILVA com sequências de referência de OTUS (Unidades Taxonômicas Operacionais)

de 99%. Os gráficos de barras sobrepostas (do inglês, stacked bar), que representam a composição taxonômica microbiana das amostras, e a α -diversidade, que descreve a diversidade/riqueza de espécies em um ecossistema ou grupo de camundongos, foram determinados e representados utilizando o site MicrobiomeAnalyst (Microbiome Analyst, 2023).

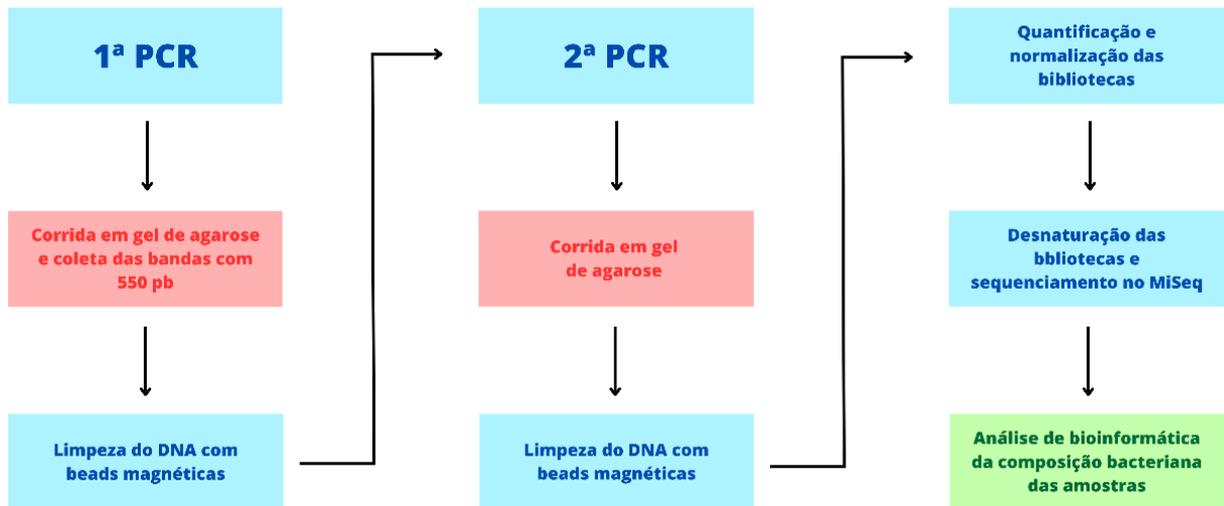


Figura 8. *Workflow* do preparo das bibliotecas de DNA para sequenciamento na plataforma MiSeq da Illumina. PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; PB = Pares de Base. Células azuis representam passos previstos no protocolo da Illumina; Células vermelhas representam passos que foram introduzidos no workflow pelo nosso grupo; Células em verde representam análises de bioinformática.

3.9. Análises estatísticas

Os dados dos testes comportamentais e análises de expressão gênica de animais doadores da microbiota e animais adultos que passaram pelo tratamento de gavagem foram analisados pelo teste T de *Student* não pareado bicaudal nas análises em que as amostras apresentaram distribuição normal e variância homogênea. As análises nas quais as amostras não atenderam esses dois pré-requisitos foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney bicaudal. Os dados de filhotes de fêmeas que passaram pelo tratamento de gavagem durante a gestação e de filhotes que passaram pelo tratamento de gavagem durante a amamentação, nos quais as amostras apresentaram distribuição normal e variância homogênea, foram analisados por

ANOVA de duas vias sendo um dos fatores a idade (21 ou 55 dias) e o outro o tratamento (gavagem com fezes ECV ou controle), seguida pelo teste de post-hoc de Bonferroni. As análises nas quais as amostras não atenderam aos pré-requisitos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn. Para todas as análises o nível de significância assumido foi de $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do protocolo de ECV nos animais doadores da microbiota

O protocolo de ECV induziu prejuízos comportamentais nos animais doadores da microbiota e alterações na expressão gênica cortical e hipocampal relacionadas a transtornos de humor como depressão e ansiedade (Figuras 9 e 10). Os animais que passaram pelo estresse apresentaram maior latência para realizar o primeiro *grooming* facial ($30,83 \pm 5,412$, $p = 0,0152$; Figura 9C) e realizaram esse comportamento um menor número de vezes ($18,83 \pm 2,372$, $p = 0,0023$; Figura 9D) que o grupo controle ($7,8 \pm 3,121$; $38,80 \pm 4,375$) no teste de *spray* de sacarose, indicando estado anedônico. Nos testes de suspensão pela cauda e labirinto em cruz elevado os animais estressados apresentaram um maior tempo de imobilidade ($114,7 \pm 9,0$, $p = 0,0078$; Figura 9E), menor tempo de exploração dos braços abertos ($6,429 \pm 1,343$, $p = 0,0164$; Figura 9F) e maior número de comportamentos de avaliação de risco ($41,76 \pm 1,576$, $p < 0,0001$; Figura 9G), quando comparado aos animais não estressados ($75,31 \pm 10,84$; $13,36 \pm 2,4$; $21,25 \pm 1,349$). O protocolo de estresse não provocou alteração no número de cruzamento entre os braços do aparato no teste de labirinto em cruz elevado ($8,476 \pm 0,5504$, $p = 0,3519$; Figura 9H) em relação ao grupo não estressado ($7,75 \pm 0,5041$). Isso indica que as alterações observadas não foram decorrentes de déficits motores

provocados pela manipulação. Respectivamente, esses dados indicam comportamento tipo depressivo e tipo ansioso nos animais estressados.

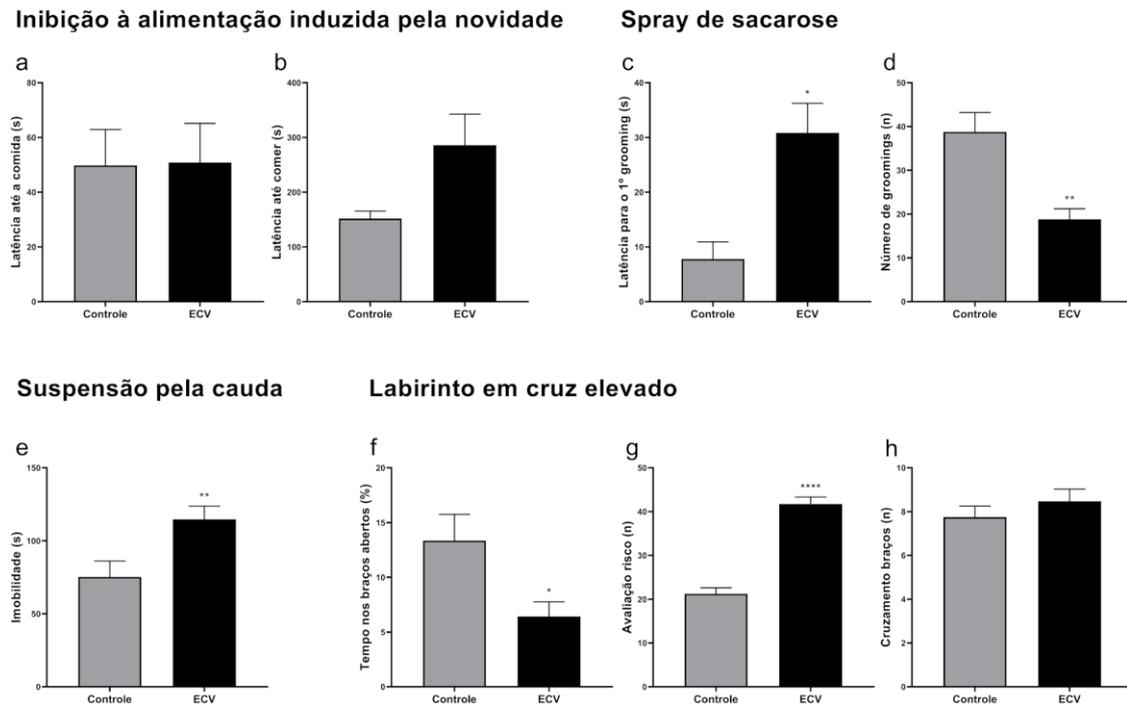


Figura 9 – Efeito do protocolo de Estresse Crônico Variado (ECV) no comportamento dos animais doadores da microbiota. **(a-b)** Teste de inibição à alimentação induzida pela novidade. **a** = Latência para encontrar a comida no centro do aparato (s). **b** = Latência para começar a comer. **(c-d)** Teste de spray de sacarose. **c** = Latência para realizar o primeiro grooming facial (s). **d** = número de groomings faciais realizados (n). **(e)** Teste de suspensão pela cauda. **e** = Tempo de imobilidade (s). **(f-h)** Teste de labirinto em cruz elevado. **f** = Tempo de exploração dos braços abertos (%). **g** = Comportamentos de avaliação de risco (n). **h** = Número de cruzamentos entre os braços fechados (n). As barras representam $M \pm SEM$. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$; * indica $P < 0,001$ pelas análises de Post-Hoc. $N = 6 - 21$.

A nível de expressão gênica, houve redução na expressão de mRNA de Sinapsina 1 (Syp1; $0,4528 \pm 0,09819$, $p = 0,0047$; Figura 10A) e Fator de transcrição de Oligodendrócitos 1 (Olig1; $0,6393 \pm 0,07051$, $p = 0,0325$; Figura 10C) no córtex pré-frontal dos animais doadores submetidos ao ECV, quando comparado aos animais não estressados ($1,207 \pm 0,32224$; $1,093 \pm 0,1778$). Em relação ao hipocampo, o protocolo de ECV provocou redução da expressão de mRNA de Olig1 ($0,6994 \pm 0,7083$, $p = 0,0493$; Figura 10D) e de SRY-Box 2 (Sox2; $0,7462 \pm 0,08431$, $p = 0,0581$; Figura 10F), comparado ao grupo controle ($1,097 \pm 0,1708$; $1,075 \pm 0,1350$).

A composição relativa da microbiota fecal a nível de filo foi similar nos animais controle e estressados, sendo que os dois filos mais abundantes foram *Firmicutes* e *Bacteroidota*, a exceção do filo *Campylobacterota*, que se encontrava presente apenas em animais estressados. A nível de classe, foi observada uma menor presença de *Bacilli* em animais estressados, classe que compreende gêneros como *Bacillus* e *Lactobacillus*, e maior presença da classe *Clostridia* e *Campylobacteria*. A nível de ordem (Figura 10G), foi observada uma maior presença de *Lachnospirales* nos animais estressados e presença de *Campylobacterales*, enquanto os animais controle apresentaram maior presença de *Lactobacillales*, que compreende o gênero *Lactobacillus*, assim como de *Oscillospirales*, *Burkholderiales* e a presença de *Erysipelotrichales*.

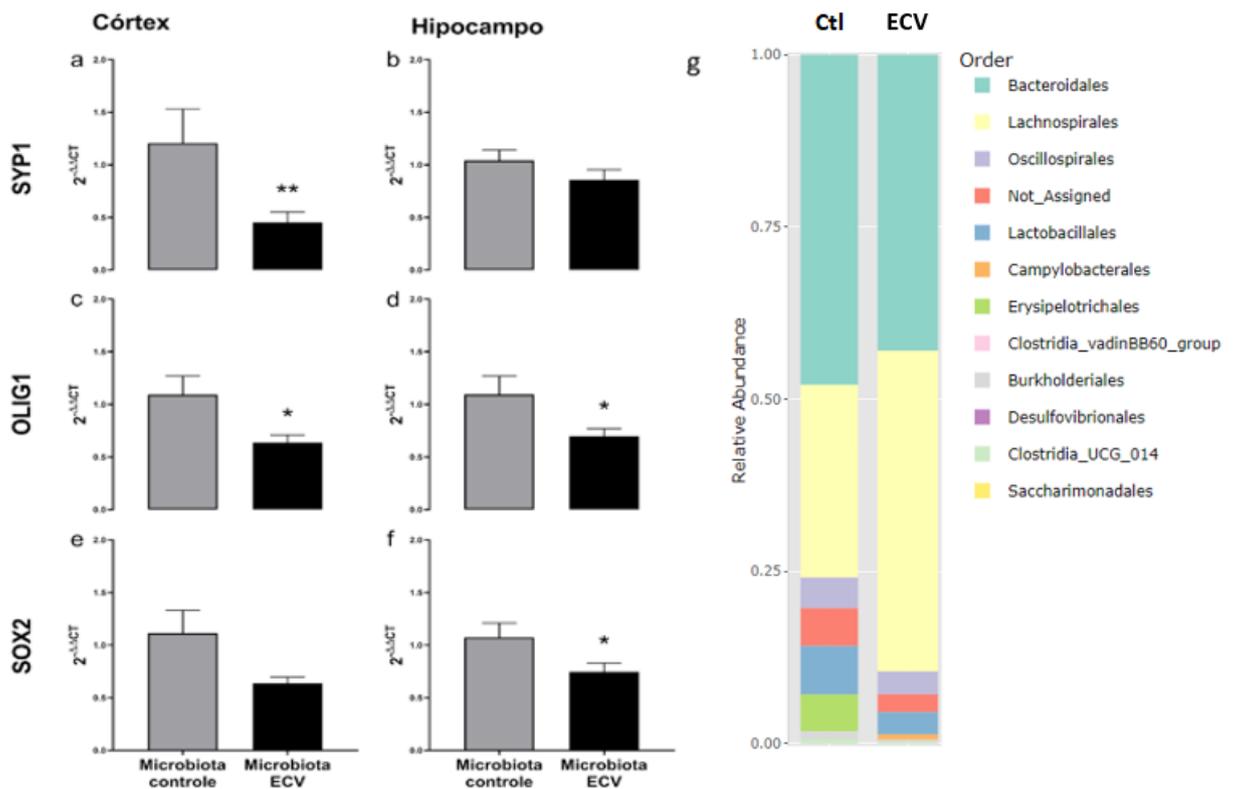


Figura 10 – Efeito do protocolo de Estresse Crônico Variado (ECV) na expressão gênica cortical e hipocampal e na composição relativa da microbiota fecal dos animais doadores da microbiota. (a-b) Expressão de Sinapsina 1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (c-d) Expressão do Fator de Transcrição de Oligodendrócitos 1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (e-f) Expressão do SRY-box 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (g) Composição relativa das populações microbianas fecais ao nível de ordem. As barras representam $M \pm SEM$. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$; * indica $P < 0,001$ pelas análises de Post-Hoc. $N = 8$

4.2. Efeitos comportamentais e de expressão gênica da disbiose entérica em animais adultos

A transferência da microbiota dos animais doadores para camundongos adultos saudáveis por 14 dias provocou prejuízos comportamentais similares aos dos animais doadores (Figura 11). Os animais que receberam a microbiota proveniente de doadores que passaram pelo protocolo de ECV apresentaram maior latência para realizar o primeiro *grooming* facial ($47,0 \pm 13,20$, $p = 0,0357$; Figura 11C) e realizaram esse comportamento um menor número de vezes ($18,0 \pm 5,033$, $p = 0,0014$; Figura 11D) no teste de *spray* de sacarose em relação aos animais que receberam a microbiota saudável ($8,20 \pm 5,054$; $42,20 \pm 1,685$). A manipulação da microbiota também provocou um aumento no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ($108,3 \pm 10,27$, $p = 0,0082$; Figura 11E) e aumento do número de comportamentos de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado ($31,56 \pm 4,703$; Figura 11G), comparado aos animais que receberam microbiota de animais não estressados ($53,00 \pm 13,99$; $17,14 \pm 2,874$).

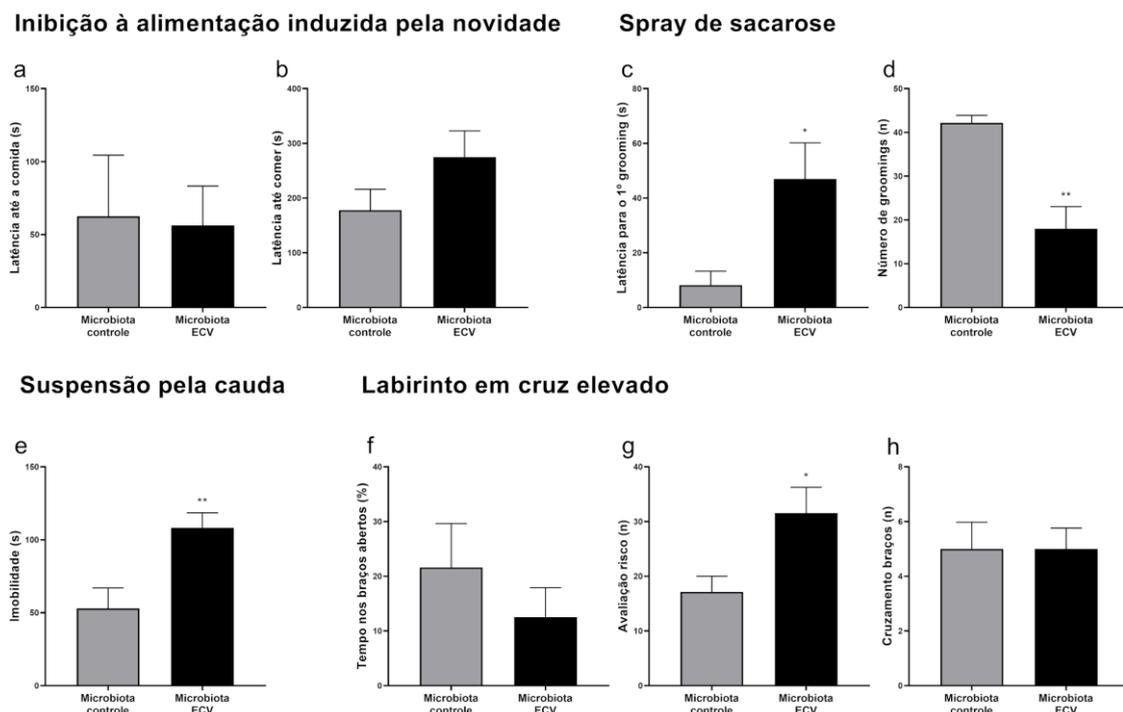


Figura 11 – Efeito da disbiose entérica no comportamento de animais Adultos. **(a-b)** Teste de inibição à alimentação induzida pela novidade. **a** = Latência para encontrar a comida no centro do aparato (s). **b** = Latência

para começar a comer. **(c-d)** Teste de spray de sacarose. **c** = Latência para realizar o primeiro grooming facial (s). **d** = número de groomings faciais realizados (n). **(e)** Teste de suspensão pela cauda. **e** = Tempo de imobilidade (s). **(f-h)** Teste de labirinto em cruz elevado. **f** = Tempo de exploração dos braços abertos (%). **g** = Comportamentos de avaliação de risco (n). **h** = Número de cruzamentos entre os braços fechados (n). As barras representam $M \pm SEM$. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$; * indica $P < 0,001$ pelas análises de Post-Hoc. $N = 3 - 12$.

A expressão gênica cortical dos animais adultos que receberam microbiota proveniente de doadores submetidos ao ECV foi prejudicada com redução na expressão de mRNA de Syp 1 ($0,7651 \pm 0,03736$, $p = 0,0228$; Figura 12A) e de Olig 1 ($0,6628 \pm 0,1391$, $p = 0,0207$; Figura 12C) em comparação aos animais que receberam a microbiota saudável ($1,032 \pm 0,09722$; $1,145 \pm 0,1990$). Contudo, não foram observadas alterações significativas na expressão hipocampal dos genes analisados (Figuras 12B, 12D e 12F).

Ao contrário dos animais doadores, nos animais receptores foram observadas diferenças na composição relativa da microbiota fecal já a nível de filo, sendo enquanto adultos que receberam microbiota proveniente de doadores controle apresentaram maior abundância de *Bacteroidota*, os que receberam de animais estressados apresentaram maior abundância de Firmicutes. Contudo, assim como nos animais doadores que foram estressados, os animais adultos que receberam sua microbiota apresentaram maior abundância de *Campylobacterota*. A nível de classe, os animais que receberam a microbiota de doadores estressados, também apresentaram maior abundância de *Clostridia* e *Campylobacteria*, assim como a redução de *Bacilli* e *Bacteroidia*. A nível de ordem (Figura 12G), foi observada uma redução de *Bacteroidales* e *Lactobacillales*, e aumento de *Lachnospirales* e *Campylobacterales* nos animais receptores da microbiota proveniente de animais estressados, assim como havia sido observado nos seus doadores.

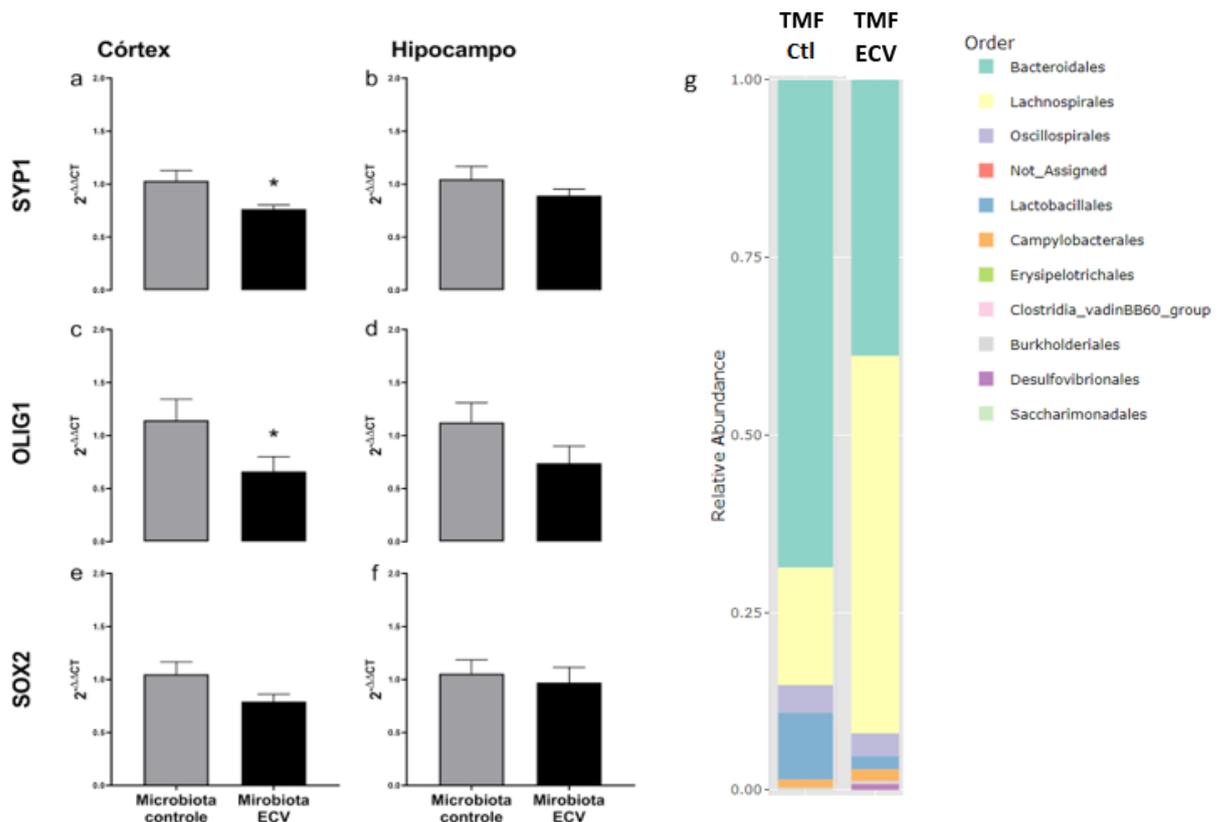


Figura 12 – Efeito da disbiose entérica na expressão gênica cortical e hipocampal e na composição relativa da microbiota fecal dos animais adultos. (a-b) Expressão de Sinapsina 1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (c-d) Expressão do Fator de Transcrição de Oligodendrócitos 1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (e-f) Expressão do SRY-box 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (g) Composição relativa das populações microbianas fecais ao nível de ordem. As barras representam $M \pm SEM$. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$; * indica $P < 0,001$ pelas análises de Post-Hoc. $N = 8$.

4.3. Efeitos da disbiose entérica gestacional materna sobre o padrão comportamental e expressão gênica na prole, avaliados com 21 e 55 dias

Os filhotes de fêmeas que sofreram disbiose gestacional apresentaram maior latência para começar a comer no teste de inibição da alimentação induzida pela novidade ($211,2 \pm 34,74$, $p = 0,0032$; Figura 13B) em comparação ao grupo controle ($90,29 \pm 7,438$), cujas mães receberam microbiota saudável durante a gestação. A disbiose gestacional também provocou maior latência para realizar o primeiro *grooming* facial ($79,57 \pm 17,46$, $X^2 = 17,79$, $p = 0,0008$; Figura 13C) e um menor número de *groomings* ($15,71 \pm 1,987$, $X^2 = 23,99$, $p = 0,0173$; Figura

13D) no teste de *spray* de sacarose em comparação ao controle ($19,14 \pm 9,891$; $25,0 \pm 2,215$) com 55 dias, indicando comportamento tipo anedônico. Também realizaram o comportamento de avaliação de risco mais vezes ($42,57 \pm 1,753$, $X^2 = 35,08$, $p = 0,0016$; Figura 13G) do que os animais do grupo controle ($22,14 \pm 2,434$) no teste de labirinto em cruz elevado. Os filhotes de fêmeas que sofreram disbiose gestacional apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda com 21 dias ($F_{3,45} = 41,0$, $p = 0,0463$; Figura 13E) em relação ao grupo controle, mas essa alteração comportamental não se manteve no grupo com 55 dias ($F_{3,45} = 41,0$, $p = 0,4138$). Nesse teste houve efeito significativo da idade ($F_{3,45} = 9,396$, $p = 0,0064$) e da microbiota gestacional ($F_{3,45} = 4,324$, $p = 0,0494$), contudo não houve interação entre esses dois fatores ($F_{3,45} = 0,8493$, $p = 0,3683$). Aos 21 dias os filhotes também apresentaram redução no número de *groomings* faciais no teste de *spray* de sacarose ($18,14 \pm 1,162$, $X^2 = 23,99$, $p = 0,0003$; Figura 13D) e aumento do comportamento de avaliação de risco ($25,71 \pm 1,563$, $X^2 = 35,08$, $p = 0,0086$; Figura 13G) no teste de labirinto em cruz elevado em comparação ao controle ($30,50 \pm 1,352$; $11,0 \pm 1,738$), indicando comportamentos relacionados à anedonia e à ansiedade. Esses resultados sugerem que os filhotes de fêmeas que sofreram disbiose gestacional apresentam comportamento tipo depressivo e tipo ansioso interpretado pelas alterações comportamentais de avaliação de risco, imobilidade e anedonia. Prejuízos comportamentais relacionados à depressão, ansiedade e anedonia aos 21 dias, porém apenas os comportamentos relacionados à ansiedade e anedonia persistem até os 55 dias (Figura 13).

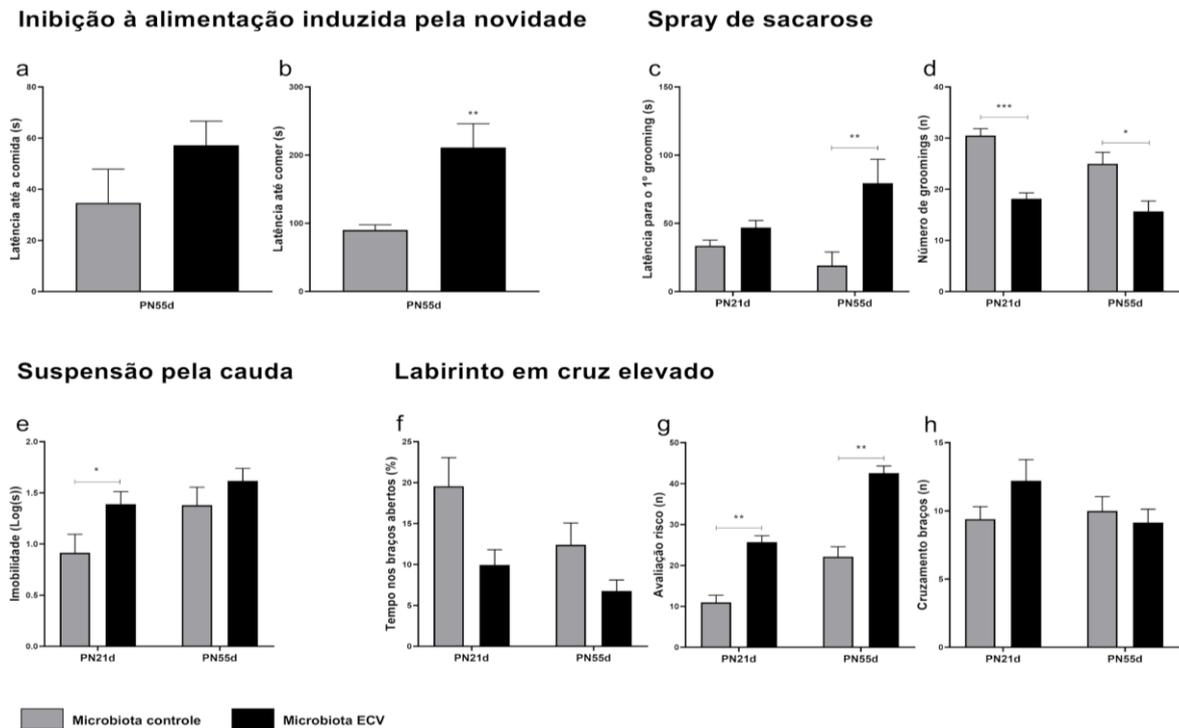
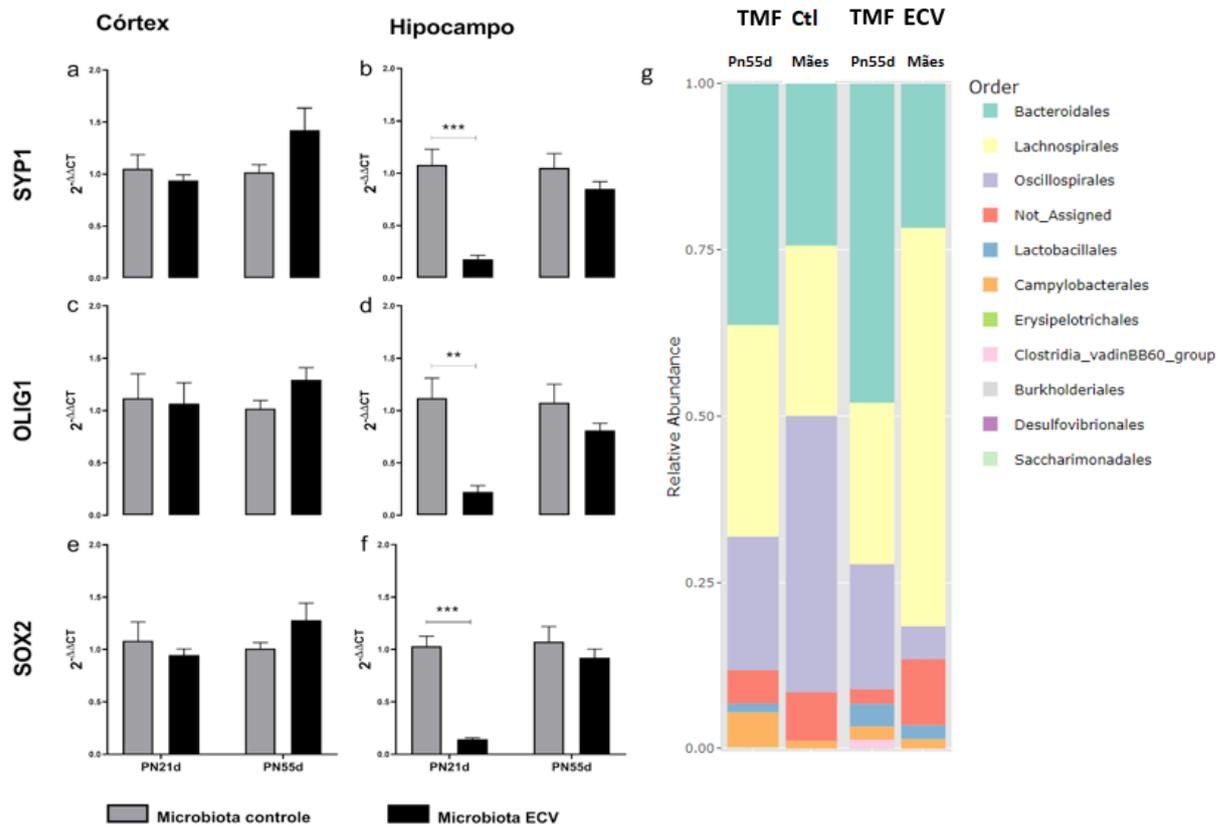


Figura 13 – Efeito da disbiose gestacional materna no comportamento da prole com 21 e 55 dias. **(a-b)** Teste de inibição à alimentação induzida pela novidade. **a** = Latência para encontrar a comida no centro do aparato (s). **b** = Latência para começar a comer. **(c-d)** Teste de spray de sacarose. **c** = Latência para realizar o primeiro grooming facial (s). **d** = número de groomings faciais realizados (n). **(e)** Teste de suspensão pela cauda. **e** = Tempo de imobilidade (s). **(f-h)** Teste de labirinto em cruz elevado. **f** = Tempo de exploração dos braços abertos (%). **g** = Comportamentos de avaliação de risco (n). **h** = Número de cruzamentos entre os braços fechados (n). As barras representam M±SEM. * indica P < 0,05; ** indica P < 0,01; *** indica P < 0,001 pelas análises de Post-Hoc. N = 7 - 14.

Os filhotes que passaram pela disbiose gestacional materna e foram analisados com 21 dias apresentaram quedas expressivas e significativas na expressão hipocampal de *Syp1* ($0,1785 \pm 0,03732$, $X^2 = 18,14$, $p = 0,0005$; Figura 14B), *Olig 1* ($0,2240 \pm 0,05884$, $X^2 = 17,94$, $p = 0,0011$; Figura 14D) e *Sox2* ($0,1446 \pm 0,1280$, $X^2 = 18,07$, $p = 0,0006$; Figura 14F) em comparação ao grupo controle ($1,080 \pm 0,1491$; $1,120 \pm 0,1902$; $1,031 \pm 0,09468$).

A caracterização da microbiota fecal foi realizada somente nos filhotes com 55 dias e nas fêmeas gestantes ao final da gestação, uma vez que aos 21 dias as fezes dos filhotes ainda não estão bem formadas e para coleta seria necessário retirar diretamente do trato gastrointestinal. A composição relativa da microbiota fecal a nível de filo foi similar entre os grupos que receberam fezes de animais controle ou estressados. Contudo, nesses grupos foi observado um maior número de microrganismos que não puderam ser caracterizados com a cobertura de sequenciamento utilizada. Ao contrário dos animais adultos doadores e

receptores, os filhotes de fêmeas que passaram pelo TMF durante a gestação com fezes de animais estressados apresentaram menor população de *Clostridia* do que de *Bacteroidia* e menor população de *Campylobacteria*, assim como maior população de *Bacilli*. Um perfil similar também foi observado a nível de ordem (Figura 14G), com aumento dos *Lachnospirales* e *Lactobacillales* e redução nos *Campylobacterales* dos filhotes após o TMF gestacional com fezes de animais estressados. Contudo, as fêmeas gestantes apresentaram maiores populações de *Clostridia* durante a gestação após o TMF de animais estressados, e a nível de ordem (Figura 13G) apresentaram maiores populações de *Lachnospirales* e *Lactobacillales* após o TMF de animais estressados.



4.4. Efeitos da disbiose entérica em animais neonatos durante a amamentação sobre o padrão comportamental e expressão gênica na prole, avaliados com 21 e 55 dias.

Os animais que sofreram disbiose durante a amamentação desenvolveram prejuízos comportamentais em todos os testes tanto com 21 quanto com 55 dias (Figura 15). Com 21 dias a disbiose durante a amamentação provocou aumento da latência para realizar o primeiro *grooming* facial ($76,18 \pm 13,92$, $X^2 = 15,30$, $p = 0,0006$; Figura 15C) no teste de *spray* de sacarose e diminuição do tempo de exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado ($7,133 \pm 1,785$, $X^2 = 28,11$, $p = 0,0141$; Figura 15F) em comparação ao grupo controle ($27,50 \pm 3,081$; $18,33 \pm 2,233$), que recebeu a microbiota de doadores saudáveis. Também provocou redução do número de *groomings* faciais ($F_{3,45} = 40,0$, $p < 0,0001$; Figura 15D) no teste de *spray* de sacarose, maior tempo de imobilidade ($F_{3,52} = 48,0$, $p < 0,0001$; Figura 15E) no teste de suspensão pela cauda e maior número de comportamentos de avaliação de risco ($F_{3,53} = 49,0$, $p < 0,0001$; Figura 15G) no labirinto em cruz elevado em relação ao controle. Com 55 dias houve aumento da latência para começar a comer ($252,6 \pm 47,12$, $p = 0,0091$; Figura 15B) no teste de inibição da alimentação induzida pela novidade em comparação ao controle ($114,3 \pm 16,06$). Também houve redução do número de *groomings* faciais ($F_{3,45} = 40,0$, $p < 0,0001$; Figura 15D) no teste de *spray* de sacarose, aumento do tempo de imobilidade ($F_{3,52} = 48,0$, $p < 0,0001$; Figura 15E) no teste de suspensão pela cauda e maior número de avaliações de risco ($F_{3,53} = 49,0$, $p < 0,0001$; Figura 15G) no teste de labirinto em cruz elevado, assim como maior tempo de exploração dos braços abertos ($7,073 \pm 2,119$, $X^2 = 28,11$, $p < 0,0001$; Figura 15F) em relação aos filhotes que receberam a microbiota saudável ($39,57 \pm 6,394$). O tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão pela cauda e o número de *groomings* faciais no teste de *spray* de sacarose apresentaram efeitos dependentes da microbiota ($F_{3,52} = 65,37$, $p < 0,0001$, Figura 15E; $F_{3,45}=79,19$, $p < 0,0001$, Figura 15D), mas independentes da idade e da interação entre os dois fatores. Já o comportamento de avaliação de risco no teste de labirinto em cruz elevado apresentou efeito dependente da microbiota ($F_{3,53}=83,29$, $p < 0,0001$; Figura 15G), independentemente da idade, mas com interação entre os dois fatores ($F_{3,53} = 13,95$, $p = 0,0012$).

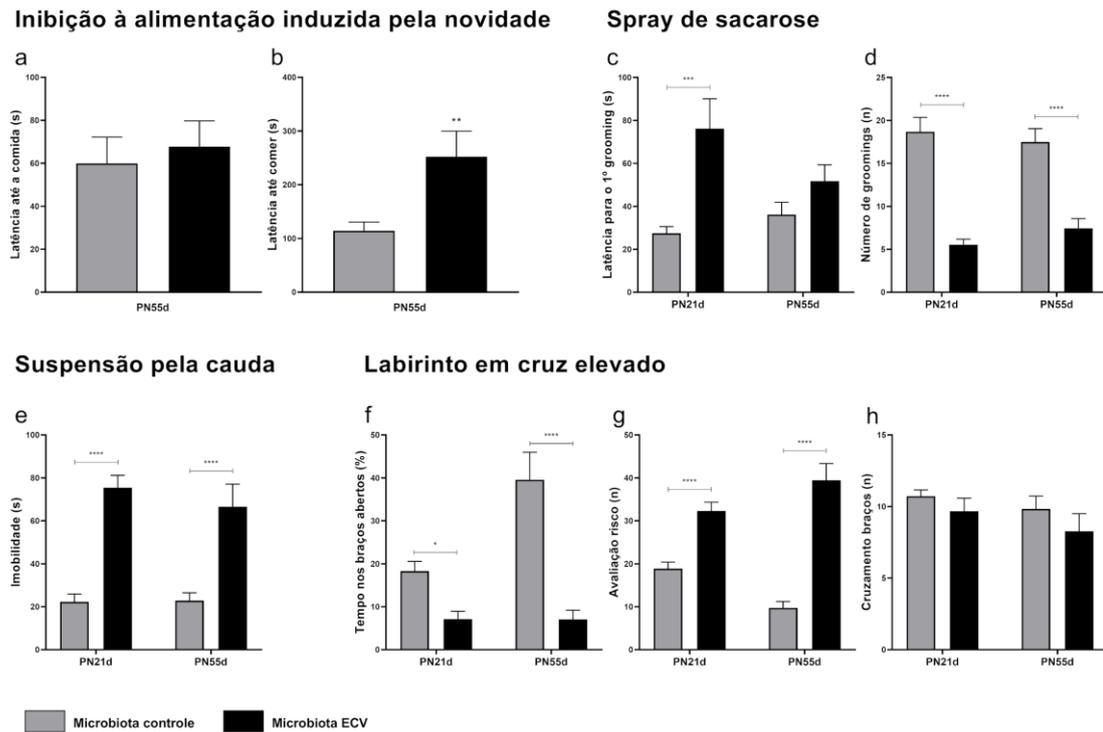
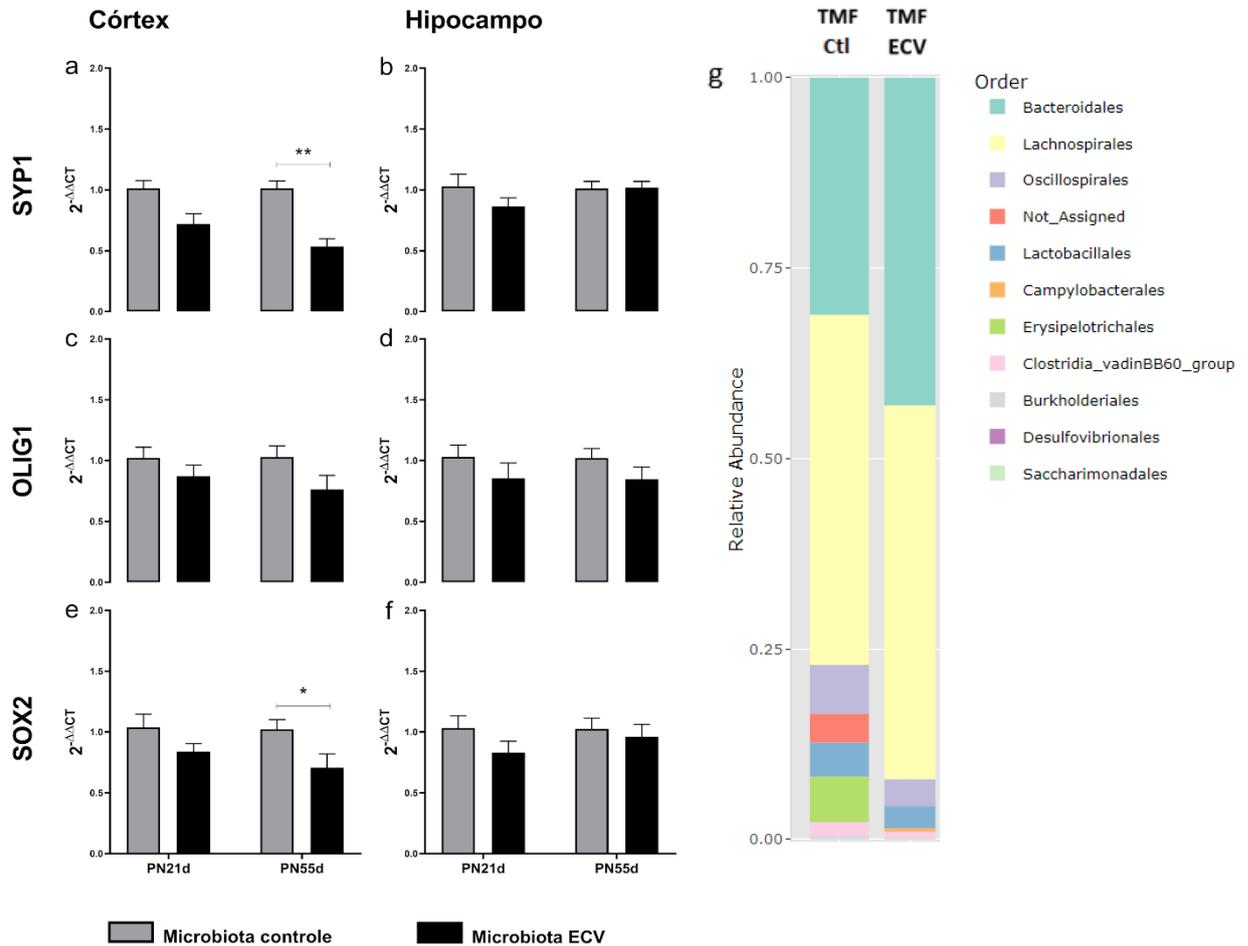


Figura 15 – Efeito da disbiose entérica durante a amamentação no comportamento de animais com 21 e 55 dias. **(a-b)** Teste de inibição à alimentação induzida pela novidade. **a** = Latência para encontrar a comida no centro do aparato (s). **b** = Latência para começar a comer. **(c-d)** Teste de spray de sacarose. **c** = Latência para realizar o primeiro grooming facial (s). **d** = número de groomings faciais realizados (n). **(e)** Teste de suspensão pela cauda. **e** = Tempo de imobilidade (s). **(f-h)** Teste de labirinto em cruz elevado. **f** = Tempo de exploração dos braços abertos (%). **g** = Comportamentos de avaliação de risco (n). **h** = Número de cruzamentos entre os braços fechados (n). As barras representam $M \pm SEM$. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$; * indica $P < 0,001$ pelas análises de Post-Hoc. $N = 10 - 18$.

Somente os filhotes com 55 dias apresentaram alterações significativas na expressão gênica cortical (Figura 16), e apenas dos genes *Syp1* ($0,5351 \pm 0,06282$, $X^2 = 16,44$, $p = 0,0016$; Figura 16A) e *Sox2* ($0,7065 \pm 0,1137$, $X^2 = 7,384$, $p = 0,0354$; Figura 16E), comparando ao grupo controle ($1,012 \pm 0,06121$; $1,023 \pm 0,07953$).

Assim como no tópico anterior, a caracterização da microbiota fecal foi realizada somente nos filhotes com 55 dias. De forma semelhante aos animais doadores, a composição relativa da microbiota fecal a nível de filo foi similar entre os grupos que receberam fezes de animais controle ou estressados. A nível de classe, os animais que receberam TMF de animais estressados durante a amamentação apresentaram redução de *Bacilli*, presença de *Campylobacteria* e redução de *Gammaproteobacteria* em comparação aos animais que receberam TMF de animais controle. A nível de ordem (Figura 16G), foi observado que após o TMF de animais estressado durante a amamentação, os animais apresentaram redução de

Oscillospirales, *Lactobacillales* e *Clostridia vadin BB60*, assim como presença de *Campylobacteriales*.



4.5. Efeitos do estresse e do TMF na diversidade da microbiota fecal

A análise da diversidade α pelo índice de Chao1, uma métrica que estima a riqueza total da comunidade microbiana frente à amostra analisada, permitindo inferir quantas espécies adicionais podem estar presentes na comunidade além das já observadas, não encontrou diferença significativa ($X^2 = 4.28$, $p = 0.23277$, Figura 17) entre os grupos de animais doadores e receptores da microbiota.

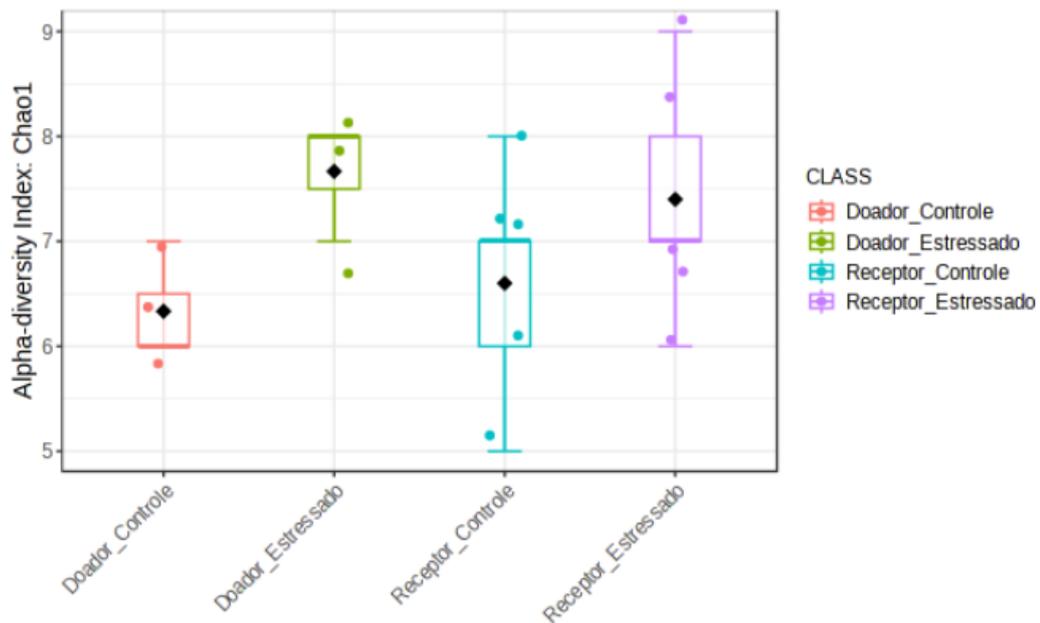


Figura 17 – Efeito do estresse e do transplante de microbiota fecal na composição da microbiota fecal. Box-plots ilustrando a α -diversidade pelo índice de Chao1 em microbiomas bacterianos entre os diferentes grupos (Doador Controle, n = 3; Doador Estressado, n = 3; Receptor Controle, n = 6; Receptor Estressado, n = 6).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos recentes métodos de sequenciamento e de caracterização metagenômica dos microrganismos presentes em amostras biológicas possibilitaram investigar em larga escala a complexidade do eixo CIM⁵⁶ e o papel da microbiota entérica sobre os diferentes aspectos do funcionamento do SNC¹⁰⁸. Neste contexto, acumulam-se evidências do papel das diferentes classes dos microrganismos residentes do intestino na origem e progressão de transtornos de humor como TDM e TAG¹⁷.

Entretanto, ainda é pouco conhecida a janela temporal na qual a disbiose entérica durante o neurodesenvolvimento pode afetar o desenvolvimento do SNC das proles, e se esses efeitos poderiam impactar a saúde mental durante a vida adulta. Sudo e colaboradores demonstraram em 2004 que os déficits regulatórios do eixo HPA em animais GF poderiam ser revertidos pela colonização desses animais com *Bifidobacterium infantis* durante fases iniciais

do período pós-natal, mas não na vida adulta²⁴, sugerindo uma janela na qual a eubiose seria fundamental para a correta regulação das respostas fisiológicas ao estresse. Esse achado se alinha com a DOHaD e já foi corroborado por estudos atuais que preveniram os efeitos da disbiose em fases iniciais do desenvolvimento tratando a prole recém-nascida com probióticos¹³² ou a deixando em *co-housing* com animais que apresentam microbiota saudável¹⁶⁹.

Além disso, análises de metagenômica em humanos mostram que o perfil da microbiota dos bebês sofre forte influência da composição da microbiota materna¹⁷⁰, bem como que alterações da microbiota materna também podem afetar o bebê nos primeiros anos de vida¹⁷¹. Esses estudos propõem a microbiota materna como um agente chave no neurodesenvolvimento da prole. Recentemente foi sugerido que essa influência já ocorre durante a gestação, onde em humanos a composição e diversidade da microbiota gestacional materna no terceiro trimestre gestacional foi correlacionada como comportamento dos filhos até 2 anos após o nascimento¹¹⁶. Alinhados com esses achados, modelos animais já demonstraram que a disbiose gestacional prejudica a comunicação axonal talamocortical, provocando prejuízos táteis¹³, e que a expressão gênica microglial sofre influência da composição da microbiota materna de forma dependente do sexo e do tempo¹⁷². Dentro dessa perspectiva, o presente estudo investigou o impacto da disbiose adquirida em diferentes momentos do desenvolvimento do SNC no comportamento e na expressão gênica pré-frontal e hipocampal dos animais.

Primeiramente foi verificado que o protocolo de ECV foi capaz de promover as alterações comportamentais associadas à depressão e à ansiedade, como previamente descrito por Monteiro e associados¹⁴⁴. De acordo com essas alterações e com a literatura, foram observadas reduções na expressão gênica cortical de *Syp1* e *Olig1*. A Sinapsina 1 é a fosfoproteína neuronal mais abundante¹⁷³ e encontra-se ligada a filamentos de actina do citoesqueleto, servindo como proteína de ancoramento para vesículas carregando neurotransmissores no neurônio pré-sináptico¹⁷⁴. Após a estimulação do neurônio, a *Syp1* é fosforilada pela Proteína Quinase A (PKA), se desprendendo das vesículas e se difundindo no botão axonal¹⁷⁴. Chin e colaboradores demonstraram em 1995 que neurônios piramidais hipocampais cultivados *in vitro* a partir de camundongos *knockout* para a *Syp1* apresentavam desenvolvimento lento dos neuritos e axônios¹⁷³. Após dias de diferenciação os dendritos

desses neurônios apresentavam poucas diferenças em relação a culturas controle, contudo, o comprimento e ramificação axonal continuava prejudicado, demonstrando a importância da Syp1 para o crescimento de processos pré-sinápticos e para a plasticidade neuronal¹⁷⁵. Além disso, estudos pré-clínicos em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado demonstraram que o estresse provocou uma menor expressão de Syp1 nos animais¹⁵⁵, corroborando com estudos clínicos que demonstram redução na expressão desse gene em pacientes com Transtorno Depressivo Maior¹⁷⁶.

O gene Olig1 é um fator transcricional hélix-volta-hélice que atua junto do seu homólogo Olig2 no processo de diferenciação e mielinização dos oligodendrócitos, células fundamentais para a regulação de sinapses e circuitarias neuronais¹⁴⁴. Em 2004, Arnett e associados haviam demonstrado que o gene Olig1 é fundamental para a remielinização em modelos de Esclerose Múltipla em camundongos¹⁷⁷. No mesmo trabalho foi observado que no período neonatal a proteína encontra-se primariamente no núcleo dos neurônios nas duas primeiras semanas, após o qual encontra-se majoritariamente no citoplasma conforme a célula se diferencia em oligodendrócitos positivos para proteína básica de mielina (MBP+). O grupo observou que em processos de remielinização provocados a partir da lesão provocada por cuprizona, lisolectina ou brometo de etídio, a proteína Olig1 voltava a ser observada no núcleo das células próximas à lesão, indetificadas como progenitores indiferenciados, e que o processo de remielinização em animais *knockout* para Olig1 era prejudicado porque esses progenitores perdiam a capacidade de se diferenciar. Já em 2015, Jinxiang e colaboradores demonstraram que camundongos *knockout* para o gene Olig1 apresentaram prejuízos já durante o neurodesenvolvimento, com déficits no comprometimento de células progenitoras, na diferenciação de oligodendrócitos e na mielinização encefálica, resultando em hipomielinização na idade adulta no cérebro¹⁷⁸. Esses trabalhos demonstram a importância da expressão de de Olig1 para processos de mielinização encefálica não apenas durante as fases iniciais do neurodesenvolvimento, mas também na vida adulta.

Contudo, o Olig 1 também atua como repressor da diferenciação de interneurônios gabaérgicos, reprimindo os potenciadores intergênicos Dlx1 e Dlx2, que são necessários para a diferenciação de interneurônios gabaérgicos¹⁴⁵. Silbereis e colaboradores demonstraram em 2014 que animais *knockout* para Olig1 apresentavam uma produção ectópica de interneurônios gabaérgicos, com um aumento de 30% na população dessas células no córtex

durante o período embrionário (E16)¹⁶⁰. O grupo observou em cultivos *in vitro* de progenitores neurais retirados em P3 que o gene *Olig1* ainda era necessário para reprimir a diferenciação em interneurônios e preservar a oligodendrogênese após o nascimento, apesar de não terem observado diferenças na população de interneurônios gabaérgicos no telencéfalo dos animais em P2. Os interneurônios gabaérgicos são encontrados em menor quantidade em pacientes com TDM e camundongos cronicamente estressados¹⁴⁶. Dessa forma, a expressão de *Olig1* deve ser finamente controlada durante o neurodesenvolvimento, uma vez que sua hiperexpressão pode provocar uma menor população de interneurônios gabaérgicos¹⁴⁵, enquanto sua hipo expressão pode causar prejuízos na mielinização do SNC¹⁴⁴. Modelos animais já demonstraram que os estresses de separação materna, o desmame precoce e o estresse crônico variado podem prejudicar a oligodendrogênese, a mielinização do córtex pré-frontal e reduzir populações de interneurônios gabaérgicos, causando alterações comportamentais associadas à depressão e ansiedade^{179–181}.

No hipocampo dos animais submetidos ao ECV foi observada uma redução da expressão de *Olig1*, sugerindo a níveis transcricionais déficits na mielinização hipocampal, e de *Sox 2*, que não apresentou alterações no córtex pré-frontal desses animais. O *Sox 2* é um fator de transcrição fundamental para manutenção da pluripotência de células tronco e para a neuroplasticidade¹⁵⁰, atuando no desenvolvimento e metabolismo do Sistema Nervoso^{150–153}, e pacientes com TDM apresentam expressão reduzida desse gene, que é revertida para níveis normais após tratamentos recentes de eletroconvulsoterapia¹⁵⁶. Recentemente, Mercurio e colaboradores realizaram uma revisão na qual analisaram *knockouts* condicionais de *Sox2* em diferentes tecidos e momentos do neurodesenvolvimento de camundongos, observando que o hipocampo é uma região particularmente sensível a deleção desse gene¹⁸². O trabalho indicou que a expressão de *Sox2* ocorre em todo o hipocampo a partir do início do seu desenvolvimento e continua ocorrendo no Giro Denteado ao longo de toda a vida, sendo importante para a diferenciação de células tronco neurais em neurônios. Contudo, a deleção de *Sox2* no hipocampo de animais adultos também provoca uma redução em células tronco neurais e neurônios granulares, demonstrando a importância da expressão desse fator transcricional mesmo na idade adulta para a manutenção do SNC¹⁸³.

Alinhadas com a literatura^{134,172} e com os prejuízos comportamentais e de expressão gênica observados, foi observado que o estresse crônico variado alterou a composição da

microbiota fecal dos animais. Zhang e colaboradores observaram em 2022¹⁸⁴ que o filo *Campylobacterota*, que compreende a classe *Campylobacteria*, ambos presentes nos animais estressados do presente trabalho, encontra-se enriquecido após protocolos de estresse crônico. Esses achados pré-clínicos corroboram com estudos clínicos conduzidos por O'Brien¹⁸⁵ e Wang¹⁸⁶, que demonstraram que infecções com o gênero *Campylobacter*, principal representante da classe *Campylobacteria*, aumentam os escores de ansiedade, depressão, somatização e traços neuróticos em pacientes, enquanto induz gastroenterite inflamatória aguda. No presente trabalho o protocolo de estresse crônico variado também favoreceu o enriquecimento da classe *Clostridia* que, segundo Medina-Rodriguez e colaboradores¹⁸⁷, é observada enriquecida em humanos com comportamento depressivo e, uma vez transplantada para camundongos, é capaz de promover prejuízos comportamentais similares de forma dependente de células Th17 do sistema imune, que também encontram-se aumentadas nos pacientes depressivos.

Outra classe que têm sido alvo de diferentes estudos é a *Bacilli*¹⁸⁸. Dela, os dois gêneros mais estudados são *Bacilli* e *Lactobacillus*¹⁸⁸, sendo que esta última tem ganhado atenção especial por sua capacidade de modular o comportamento de camundongos^{50,115}. *Lactobacillus* são historicamente considerados parte integrante do microbioma intestinal humano, mas hoje há um grande corpo de evidências indicando que apenas um pequeno número de espécies de *Lactobacillus* são verdadeiramente habitantes autóctones do trato gastrointestinal de mamíferos, e que a maioria dos *Lactobacillus* presentes são membros alóctones derivados de alimentos ou da cavidade oral¹⁸⁸. O conteúdo de espécies de *Lactobacillus* em amostras fecais é caracterizado por flutuações temporais e de falta de estabilidade^{189,190}, e fatores como o estilo de nutrição afetam significativamente sua presença no intestino, onde, apesar de dominarem o duodeno e o jejuno, constituem apenas uma pequena fração dentro do microbioma fecal humano, cerca de 0,01 a 0,06% do total de contagens bacterianas¹⁸⁸.

Desse modo, é inesperado que mesmo representando uma fração tão pequena do microbioma dos mamíferos, a classe *Bacilli* e o gênero *Lactobacillus* exerçam papéis tão importantes para o comportamento do hospedeiro⁵⁰. Como apresentado anteriormente, Sgritta e associados⁵⁰ demonstraram que a espécie *Lactobacillus reuteri* era capaz de reverter os déficits sociais em modelos animais de TEA de forma vagal dependente, através da

atividade do sistema ocitocina-dopamina na ATV. Em 2021, Qiu e colaboradores¹⁹¹ demonstraram que a espécie *Lactobacillus delbrueckii* conseguia amenizar o comportamento tipo depressivo em camundongos tratados com LPS através da inibição de receptores Toll-Like-4 que estavam mediando ativação microglial excessiva. Por outro lado, tanto o tratamento com *Lactobacillus helveticus*¹⁹² quanto com *Lactobacillus reuteri*¹⁹³ em modelos animais já demonstraram aumentar os níveis de serotonina no intestino, cérebro e hipocampo, melhorando o comportamento tipo depressivo dos modelos. Por fim, outra via investigada pela gêneros da classe *Bacilli* podem interagir com o SNC é através da produção de metabólitos como os AGCC¹⁹⁴, metabólitos capazes de atravessar a barreira hematoencefálica^{90,195,196}, regular a expressão gênica^{90,196}, e atenuar o comportamento tipo depressivo em modelos animais através da restauração da neurogênese hipocampal e da integridade da barreira hematoencefálica¹⁹⁵. Alinhado com a literatura, o presente estudo observou uma redução da classe *Bacilli* e da ordem *Lactobacillales*.

Com a observação desses fenótipos relacionados ao comportamento tipo depressivo e tipo ansioso provocados pelo protocolo de ECV nos animais doadores, foi possível utilizar suas fezes para a realização do protocolo de TMF. Estudos como o de Chevalier e associados demonstraram que a transferência de fezes de animais cronicamente estressados para animais adultos saudáveis provoca prejuízos comportamentais semelhantes aos dos animais doadores¹³⁴. Dessa forma, após a validação do modelo de estresse nos animais doadores, o presente trabalho se propôs a transplantar suas fezes para animais adultos, que apresentaram alterações da composição relativa da microbiota fecal e déficits comportamentais semelhantes aos dos doadores, validando o modelo de TMF proposto. Os prejuízos de expressão gênica no córtex pré-frontal provocados pelo protocolo de ECV também foram observados nos animais adultos receptores, com redução dos níveis de Sinapsina 1 e Fator de transcrição de oligodendrócitos 1 (Olig1), sugerindo, a nível de expressão gênica, um possível déficit na comunicação sináptica¹⁵⁸ e na oligodendrogênese¹⁷⁸ cortical, que não foram observadas a nível hipocampal.

Esses resultados corroboram com dados prévios da literatura, de modelos clínicos e pré-clínicos, sugerindo que a microbiota contida nas fezes de animais com padrão comportamental compatível com os transtornos de humor e ansiedade é capaz de induzir alterações semelhantes às dos doadores dos microrganismos¹⁷, o que será validado a partir

das análises metagenômica de composição dos microrganismos a serem realizadas futuramente. Neste estudo foram utilizados animais saudáveis tratados com antibiótico para reduzir o número de microrganismos residentes antes do tratamento de gavagem, ao invés de camundongos *germ-free*, pois os animais que crescem sem bactérias residentes já apresentam naturalmente alterações fisiológicas e comportamentais em relação à animais saudáveis¹³⁵. Estes dados em conjunto sugerem ainda que a microbiota entérica do indivíduo adulto pode induzir alterações comportamentais compatíveis com os TDM e TAG, mediante alterações estruturais relacionadas a plasticidade sináptica, oligodendrogênese e neurogênese.

O comportamento dos filhotes de fêmeas que sofreram disbiose durante a gestação apresentaram alterações comportamentais tanto com 21 quanto com 55 dias, sugerindo que a microbiota gestacional materna apresenta um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes, possivelmente facilitando o desenvolvimento de déficits comportamentais na prole em quadros de disbiose gestacional. Esses achados corroboram com o estudo realizado recentemente por Vuong e colaboradores¹³, que alteram a microbiota de fêmeas gestantes com antibióticos e observaram prejuízos na prole a nível de comportamentos motores, decorrentes de alterações na axogênese, com a formação de axônios thalamocorticais deficientes.

Contudo, no presente estudo, apesar dos animais demonstrarem aumento no tempo de imobilidade no teste de SC com 21 dias decorrente do TMF com fezes provenientes de animais estressados, esse prejuízo não se manteve no grupo analisado com 55 dias. Este achado sugere uma restauração, ao menos em partes, das alterações comportamentais induzidas pelo TMF durante a gestação. Entretanto, essa melhora não é observada nos comportamentos relacionados à ansiedade ou à anedonia. Apesar da anedonia ser frequentemente observada em pacientes com Transtorno Depressivo Maior⁵³, sua neurobiologia está relacionada com circuito mesolímbico, que consiste em projeções dopaminérgicas da Área Tegmentar Ventral (ATV) para o estriado ventral, incluindo o Núcleo Accumbens⁵². Dessa forma a intensidade do comportamento anedônico, mas não da depressão, foi negativamente correlacionada em humanos com a atividade da ATV em resposta a estímulos agradáveis⁵², o que corrobora com os nossos resultados. No mais, como discutido previamente, Sgritta e associados demonstraram recentemente que o tratamento com *Lactobacillus reuteri* consegue reverter

déficits sociais em animais via Nervo Vago justamente estimulando a ATV, que também é crucial para o comportamento social, a partir da ativação de neurônios ocitocinérgicos no Núcleo Paraventricular⁵⁰. Esses dados sugerem uma possível desregulação do sistema Ocitocina-Dopamina presente no nosso modelo, que deverá ser investigada futuramente, com foco nos comportamentos sociais e relacionados à anedonia.

A nível de expressão gênica, a prole com 21 dias gerada por fêmeas que sofreram o TMF com fezes provenientes de camundongos estressados foi o grupo que apresentou maiores prejuízos no presente estudo. Em humanos já foi demonstrado que durante a gestação o SNC apresenta a maioria dos genes regulados positivamente, sendo que em determinado momento do neurodesenvolvimento chega a expressar 85% dos genes de todo o genoma¹⁹⁷. E em roedores já foi demonstrado até o nascimento as diferentes regiões encefálicas não apresentam elevada dissimilaridade da expressão gênica¹⁹⁸. Essas regiões apresentam perfis de expressão cada vez mais semelhantes durante o desenvolvimento embrionário inicial, dominado por genes responsáveis pela construção e modelagem do encéfalo, enquanto após o nascimento as regiões tendem a se especializar e aumentar a dissimilaridade na expressão gênica, dominadas por genes que governam a operação do sistema nervoso como a atividade neural e a plasticidade¹⁹⁸. O encéfalo conta com uma característica hiper expressão de RNAm¹⁹⁹, sugerindo que a etapa transcricional da expressão gênica pode ter uma importância particular nesse momento do desenvolvimento. Desse modo, estímulos ambientais, como metabólitos produzidos pela microbiota materna, que alteram os processos transcricionais normativos como a compactação da cromatina, podem ter impactos consideráveis nessa etapa do desenvolvimento.

Já foi demonstrado que moléculas produzidas pela microbiota materna são capazes de atravessar a placenta e influenciar o desenvolvimento dos embriões, como é o caso dos ácidos graxos de cadeia curta²⁰⁰. Esses metabólitos são potentes inibidores das histonas deaceticelases⁹², mantendo a cromatina descondensada e assim possibilitando a expressão de diversos genes. Desse modo, uma menor produção de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota materna em estado disbiótico pode ser uma possível explicação da redução da expressão gênica observada nos filhotes com 21 dias. Com o crescimento dos animais e o consequente controle mais fino da expressão gênica, responsável pela maior diferenciação

entre as estruturas¹⁹⁸, é de se esperar que os filhotes não apresentem mais esses prejuízos com 55 dias.

Ao contrário dos animais adultos doadores e receptores, a microbiota das fêmeas gestantes que receberam o transplante de microbiota fecal tanto do grupo controle quanto do grupo estressado não adotou um perfil similar ao dos doadores, o que era esperado uma vez que existe dimorfismo sexual na composição da microbiota em humanos e outros mamíferos devido a diferenças hormonais, que podem ser revertidas com tratamento hormonal²⁰¹, e genéticas, especialmente as que tangem o sistema imune^{201,202}. Contudo, apesar das diferenças em comparação aos doadores, foi observada diferença entre os grupos de fêmeas gestantes que receberam microbiota de animais controle e estressados, indicando que o TMF foi capaz de modular a microbiota dessas fêmeas com influência do sexo. De todos os grupos analisados no presente trabalho, os filhotes com 55 dias de fêmeas que passaram pelo TMF durante a gestação foram os que apresentaram maiores diferenças na composição relativa da microbiota fecal em comparação aos doadores, inclusive os que receberam TMF de animais estressados, que apresentaram um perfil similar ao observado nos animais controle dos demais grupos. A restauração do perfil da microbiota pode ter contribuído para a diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda dos animais filhos de fêmeas que receberam TMF de animais estressados durante a gestação. Contudo, como discutido anteriormente, esses animais apresentaram prejuízos comportamentais relacionados à ansiedade e anedonia que se mantiveram até os 55 dias, indicando que mesmo após a restauração de um perfil de microbiota similar a animais controle quando adultos, a disbiose gestacional pode provocar prejuízos comportamentais em animais adultos. Esse achado está de acordo com os achados de Sudo e colaboradores²⁴, corroborando com a existência de uma janela temporal na qual a eubiose seria fundamental para o neurodesenvolvimento e sugerindo que essa janela englobe o período gestacional para determinados comportamentos.

O grupo que sofreu disbiose durante o período de amamentação apresentou os maiores prejuízos comportamentais observados no presente estudo, assim como alterações na composição da microbiota que foram observadas até mesmo com 55 dias. Isso está de acordo a Hipótese das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD)¹¹¹, que baseada em estudos pré-clínicos^{203,204} e clínicos²⁰⁵ descreve a importância do período neonatal para o

desenvolvimento e amadurecimento das diversas vias encefálicas responsáveis pelo comportamento normativo, no qual a disbiose entérica pode provocar déficits comportamentais duradouros²⁰⁴. Contudo, somente os filhotes com 55 dias apresentaram alterações na expressão gênica cortical, e somente dos genes Sinapsina 1 e Sox2.

Os filhotes com 21 dias que sofreram o TMF durante a amamentação não apresentaram os mesmos prejuízos na expressão gênica presentes nos filhotes com 21 dias de fêmeas que sofreram o TMF. E, como discutido anteriormente, os filhotes com 55 dias de fêmeas que sofreram o TMF de animais estressados apresentaram um perfil de microbiota diferente do observado em suas mães, o que pode ser explicado pelo dimorfismo sexual, mas também diferente dos animais doadores. Isso sugere que os prejuízos observados frente a disbiose gestacional não foram adquiridos devido à uma contaminação com os microrganismos da mãe durante a amamentação e sim através de alguma comunicação que ocorreu durante o período gestacional.

Por fim, no presente estudo, identificamos algumas limitações relacionadas à qualidade do sequenciamento das amostras de microbioma. Devido a essas limitações, a análise do microbioma foi conduzida apenas com as fitas *forward*, restringindo a caracterização taxonômica até o nível de Ordem. Como resultado, não obtivemos informações sobre níveis taxonômicos mais específicos. Para superar essa limitação e obter uma análise mais detalhada do microbioma, faz-se necessário o sequenciar as mostras novamente, possibilitando um aprofundamento do nível de sequenciamento. Dessa forma, será viável a identificação de grupos taxonômicos em níveis menores, permitindo uma compreensão mais aprofundada da composição e diversidade microbiana presente nas amostras.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que o TMF em diferentes momentos da vida do camundongo pode provocar prejuízos comportamentais e de expressão gênica nas proles. É possível concluir que quando o TMF ocorre durante a gestação, além dos prejuízos

comportamentais, os filhotes sofrem grandes alterações transcricionais durante a fase juvenil, que não são observadas na prole com 55 dias. Por outro lado, as alterações comportamentais são mais evidentes se a disbiose ocorre durante a amamentação e perduram até os 55 dias, indicando que a colonização da microbiota intestinal que ocorre no período neonatal tem grande influência no comportamento dos animais na vida adulta, conforme a DOHaD.

Tais resultados corroboram com a nossa hipótese de que a colonização da microbiota ao longo de diferentes momentos do desenvolvimento, inclusive da microbiota materna durante o período gestacional, pode induzir alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroestruturais relevantes para a saúde mental do indivíduo adulto. Contudo, análises do perfil imunológico e de metilação e acetilação de histonas, assim como de modificações pós-traducionais, são necessárias para entender as possíveis vias pelas quais o controle da expressão gênica está sendo realizado nessa comunicação ao longo do desenvolvimento da prole.

REFERÊNCIAS

1. Cavalazzi, B. *et al.* Cellular remains in a ~3.42-billion-year-old seafloor hydrothermal environment. *Sci Adv* **7**, (2021).
2. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* **474**, 1823–1836 (2017).
3. Chu, D. M. *et al.* Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* **23**, 314–326 (2017).
4. Martino, C. *et al.* Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. *Nat Rev Microbiol* (2022) doi:10.1038/s41579-022-00768-z.
5. Matijašić, M. *et al.* Gut Microbiota beyond Bacteria—Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int J Mol Sci* **21**, 2668 (2020).
6. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11971–11975 (2010).
7. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**, e1002533 (2016).

8. Alam, R., Abdolmaleky, H. M. & Zhou, J. R. Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics* **174**, 651–660 (2017).
9. Grice, E. A. & Segre, J. A. The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **13**, 151–170 (2012).
10. Brooks, A. W., Kohl, K. D., Brucker, R. M., van Opstal, E. J. & Bordenstein, S. R. Phylosymbiosis: Relationships and Functional Effects of Microbial Communities across Host Evolutionary History. *PLoS Biol* **14**, e2000225 (2016).
11. De Agüero, M. G. *et al.* The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science (1979)* **351**, 1296–1302 (2016).
12. Clarke, G. *et al.* Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology* **28**, 1221–1238 (2014).
13. Vuong, H. E. *et al.* The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature* **2020 586:7828** **586**, 281–286 (2020).
14. Kundu, P. *et al.* Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci Transl Med* **11**, (2019).
15. Garrett, W. S. Cancer and Microbiota. *Physiol Behav* **176**, 139–148 (2017).
16. Fomby, P. & Cherlin, A. J. Role of microbiota in immunity and inflammation. *National Institute of Health* **72**, 181–204 (2011).
17. Winter, G., Hart, R. A., Charlesworth, R. P. G. & Sharpley, C. F. Gut microbiome and depression : what we know and what we need to know. (2018) doi:10.1515/revneuro-2017-0072.
18. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 313–323 (2009).
19. Agranyoni, O. *et al.* Gut microbiota determines the social behavior of mice and induces metabolic and inflammatory changes in their adipose tissue. *NPJ Biofilms Microbiomes* **7**, 28 (2021).
20. Braniste, V. *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* **6**, (2014).
21. Luczynski, P. *et al.* Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **19**, pyw020 (2016).
22. Scott, G. A. *et al.* Disrupted Neurogenesis in Germ-Free Mice: Effects of Age and Sex. *Front Cell Dev Biol* **8**, (2020).
23. Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V. & Gordon, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15451–15455 (2002).
24. Sudo, N. *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic – pituitary – adrenal system for stress response in mice. **1**, 263–275 (2004).

25. Stripling, J. & Rodriguez, M. Current Evidence in Delivery and Therapeutic Uses of Fecal Microbiota Transplantation in Human Diseases—Clostridium difficile Disease and Beyond. *Am J Med Sci* **356**, 424–432 (2018).
26. EISEMAN, B., SILEN, W., BASCOM, G. S. & KAUVAR, A. J. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* **44**, 854–9 (1958).
27. Cullen, C. M. *et al.* Emerging Priorities for Microbiome Research. *Front Microbiol* **11**, (2020).
28. Cani, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**, 1716–1725 (2018).
29. Browne, H. P., Neville, B. A., Forster, S. C. & Lawley, T. D. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nat Rev Microbiol* **15**, 531–543 (2017).
30. Ito, T., Sekizuka, T., Kishi, N., Yamashita, A. & Kuroda, M. Conventional culture methods with commercially available media unveil the presence of novel culturable bacteria. *Gut Microbes* **10**, 77–91 (2019).
31. Nichols, D. *et al.* Use of Ichip for High-Throughput *In Situ* Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2445–2450 (2010).
32. Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R. & Blaser, M. J. Role of the microbiome in human development. *Gut* **68**, 1108–1114 (2019).
33. Koutsouris, D. The evolution of medical care: from the beginnings to personalized medicine. *Health Technol (Berl)* **7**, 3–4 (2017).
34. Opal, S. M. A Brief History of Microbiology and Immunology. in *Vaccines: A Biography* 31–56 (Springer New York, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-1108-7_3.
35. Rosenqvist, T., Mitchell, C. & Willetts, J. A short history of how we think and talk about sanitation services and why it matters. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development* **6**, 298–312 (2016).
36. Ribeiro da Cunha, Fonseca & Calado. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics* **8**, 45 (2019).
37. Bager, P., Wohlfahrt, J. & Westergaard, T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: Meta-analyses. *Clinical and Experimental Allergy* **38**, 634–642 (2008).
38. Thavagnanam, S., Fleming, J., Bromley, A., Shields, M. D. & Cardwell, C. R. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clinical and Experimental Allergy* **38**, 629–633 (2008).
39. Cardwell, C. R. *et al.* Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* **51**, 726–735 (2008).
40. Pei, Z. *et al.* Cesarean delivery and risk of childhood obesity. *Journal of Pediatrics* **164**, 1068–1073.e2 (2014).
41. Lebovitz, Y. *et al.* Lactobacillus rescues postnatal neurobehavioral and microglial dysfunction in a model of maternal microbiome dysbiosis. *Brain Behav Immun* **81**, (2019).
42. Petra, A. I. *et al.* Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders with Suspected Immune Dysregulation. *Clin Ther* **37**, 984–995 (2015).

43. Gibbons, C. H. Basics of autonomic nervous system function. in 407–418 (2019). doi:10.1016/B978-0-444-64032-1.00027-8.
44. Bohórquez, D. V. *et al.* An Enteroendocrine Cell – Enteric Glia Connection Revealed by 3D Electron Microscopy. *PLoS One* **9**, e89881 (2014).
45. Vázquez, E. *et al.* Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. *J Nutr Biochem* **26**, 455–465 (2015).
46. Bonaz, B. L. & Bernstein, C. N. Brain-Gut Interactions in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **144**, 36–49 (2013).
47. Mayer, E. A. & Tillisch, K. The Brain-Gut Axis in Abdominal Pain Syndromes. *Annu Rev Med* **62**, 381–396 (2011).
48. Rhee, S. H., Pothoulakis, C. & Mayer, E. A. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**, 306–314 (2009).
49. Breit, S., Kupferberg, A., Rogler, G. & Hasler, G. Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Front Psychiatry* **9**, (2018).
50. Sgritta, M. *et al.* Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* **101**, 246-259.e6 (2019).
51. Yu, X. *et al.* Dysfunction of ventral tegmental area GABA neurons causes mania-like behavior. *Mol Psychiatry* **26**, 5213–5228 (2021).
52. Der-Avakian, A. & Markou, A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci* **35**, 68–77 (2012).
53. Cooper, J. A., Arulpragasam, A. R. & Treadway, M. T. Anhedonia in depression: biological mechanisms and computational models. *Curr Opin Behav Sci* **22**, 128–135 (2018).
54. Yang, C. *et al.* Key role of gut microbiota in anhedonia-like phenotype in rodents with neuropathic pain. *Transl Psychiatry* **9**, 57 (2019).
55. Zhao, Y. *et al.* Antidepressant-like effects of *Lactobacillus plantarum* DP189 in a corticosterone-induced rat model of chronic stress. *Behavioural Brain Research* **395**, 112853 (2020).
56. Cryan, J. F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* **99**, 1877–2013 (2019).
57. Gershon, M. D. The Enteric Nervous System: A Second Brain. *Hosp Pract* **34**, 31–52 (1999).
58. Mayer, E. A. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat Rev Neurosci* **12**, 453–466 (2011).
59. Goldstein, A., Hofstra, R. & Burns, A. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet* **83**, 307–316 (2013).
60. Garipey, C. E. Intestinal Motility Disorders and Development of the Enteric Nervous System. *Pediatr Res* **49**, 605–613 (2001).

61. Kabouridis, P. S. & Pachnis, V. Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. *Journal of Clinical Investigation* **125**, 956–964 (2015).
62. Hyland, N. P. & Cryan, J. F. Microbe-host interactions: Influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev Biol* **417**, 182–187 (2016).
63. Lyte, M. & Ernst, S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci* **50**, 203–212 (1992).
64. Lyte, M. & Ernst, S. Alpha and Beta Adrenergic Receptor Involvement in Catecholamine-Induced Growth of Gram-Negative Bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **190**, 447–452 (1993).
65. Barandouzi, Z. A. *et al.* Associations of neurotransmitters and the gut microbiome with emotional distress in mixed type of irritable bowel syndrome. *Sci Rep* **12**, 1648 (2022).
66. Yano, J. M. *et al.* Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* **161**, 264–276 (2015).
67. Barandouzi, Z. A. *et al.* Associations of neurotransmitters and the gut microbiome with emotional distress in mixed type of irritable bowel syndrome. *Sci Rep* **12**, 1648 (2022).
68. Xue, R. *et al.* Peripheral Dopamine Controlled by Gut Microbes Inhibits Invariant Natural Killer T Cell-Mediated Hepatitis. *Front Immunol* **9**, (2018).
69. Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science (1979)* **336**, 1268–1273 (2012).
70. Olszak, T. *et al.* Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science (1979)* **336**, 489–493 (2012).
71. Sanidad, K. Z. & Zeng, M. Y. Neonatal gut microbiome and immunity. *Curr Opin Microbiol* **56**, 30–37 (2020).
72. Jung, C., Hugot, J.-P. & Barreau, F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam* **2010**, (2010).
73. Cha, H.-R. *et al.* Downregulation of Th17 Cells in the Small Intestine by Disruption of Gut Flora in the Absence of Retinoic Acid. *The Journal of Immunology* **184**, 6799–6806 (2010).
74. Ribeiro, R., Nicoli, J. R., Santos, G. & Lima-Santos, J. Impact of vitamin deficiency on microbiota composition and immunomodulation: relevance to autistic spectrum disorders. *Nutr Neurosci* **0**, 1–13 (2019).
75. Rogers, G. B. *et al.* From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry* **21**, 738–748 (2016).
76. Kang, V., Wagner, G. C. & Ming, X. Gastrointestinal Dysfunction in Children With Autism Spectrum Disorders. *Autism Research* **7**, 501–506 (2014).
77. Verma, R. *et al.* Cell surface polysaccharides of *Bifidobacterium bifidum* induce the generation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Sci Immunol* **3**, (2018).
78. Ohnmacht, C. *et al.* The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t⁺ T cells. *Science (1979)* **349**, 989–993 (2015).

79. Atarashi, K. *et al.* Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species. *Science (1979)* **331**, 337–341 (2011).
80. Wang, Y. *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Flagellins From Segmented Filamentous Bacteria. *Front Immunol* **10**, (2019).
81. Wesemann, D. R. *et al.* Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature* **501**, 112–115 (2013).
82. Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B. & McCoy, K. D. Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels. *Cell Host Microbe* **14**, 559–570 (2013).
83. Powell, N., Walker, M. M. & Talley, N. J. The mucosal immune system: Master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 143–159 (2017).
84. Waclawiková, B., Codutti, A., Alim, K. & El Aidy, S. Gut microbiota-motility interregulation: insights from *in vivo*, *ex vivo* and *in silico* studies. *Gut Microbes* **14**, (2022).
85. Messaoudi, M. *et al.* Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition* **105**, 755–764 (2011).
86. Tennoune, N. *et al.* Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α -MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry* **4**, e458–e458 (2014).
87. Aarts, E. *et al.* Gut microbiome in ADHD and its relation to neural reward anticipation. *PLoS One* **12**, e0183509 (2017).
88. Han, H. *et al.* From gut microbiota to host appetite: gut microbiota-derived metabolites as key regulators. *Microbiome* **9**, 162 (2021).
89. Bäckhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15718–15723 (2004).
90. Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B. & Verbeke, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2019) doi:10.1038/s41575-019-0157-3.
91. Schroeder, F. A., Lin, C. L., Crusio, W. E. & Akbarian, S. Antidepressant-Like Effects of the Histone Deacetylase Inhibitor, Sodium Butyrate, in the Mouse. *Biol Psychiatry* **62**, 55–64 (2007).
92. Lin, M. Y., De Zoete, M. R., Van Putten, J. P. M. & Strijbis, K. Redirection of epithelial immune responses by short-chain fatty acids through inhibition of histone deacetylases. *Front Immunol* **6**, 554 (2015).
93. Schönfeld, P. & Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res* **57**, 943–954 (2016).
94. Burger-van Paassen, N. *et al.* The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochemical Journal* **420**, 211–219 (2009).

95. Pluznick, J. L. Microbial Short-Chain Fatty Acids and Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep* **19**, 25 (2017).
96. Tahara, Y. *et al.* Gut Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids Induce Circadian Clock Entrainment in Mouse Peripheral Tissue. *Sci Rep* **8**, 1395 (2018).
97. Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L. & Prinz, M. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. *Immunology* **150**, 7–15 (2017).
98. Morita, C. *et al.* Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa. *PLoS One* **10**, e0145274 (2015).
99. Unger, M. M. *et al.* Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord* **32**, 66–72 (2016).
100. Zhang, L. *et al.* Altered Gut Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **60**, 1241–1257 (2017).
101. Liu, S. *et al.* Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Sci Rep* **9**, 287 (2019).
102. Müller, B. *et al.* Fecal Short-Chain Fatty Acid Ratios as Related to Gastrointestinal and Depressive Symptoms in Young Adults. *Psychosom Med* **83**, 693–699 (2021).
103. van de Wouw, M. *et al.* Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Physiol* **596**, 4923–4944 (2018).
104. McLoughlin, R. F., Berthon, B. S., Jensen, M. E., Baines, K. J. & Wood, L. G. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* ajcn156265 (2017) doi:10.3945/ajcn.117.156265.
105. Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F. & Dinan, T. G. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol* **2 DEC**, 1–15 (2011).
106. Grandjean, P. & Landrigan, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol* **13**, 330–338 (2014).
107. Drell, T. *et al.* The Influence of Different Maternal Microbial Communities on the Development of Infant Gut and Oral Microbiota. *Sci Rep* **7**, (2017).
108. Bäckhed, F. *et al.* Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* **17**, 690–703 (2015).
109. Lu, L. *et al.* Transcriptional modulation of intestinal innate defense/inflammation genes by preterm infant microbiota in a humanized gnotobiotic mouse model. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
110. Lu, J. *et al.* Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Rep* **8**, 1–16 (2018).
111. Heindel, J. J. & Vandenberg, L. N. Developmental origins of health and disease. *Curr Opin Pediatr* **27**, 248–253 (2015).
112. O'Mahony, S. M., Clarke, G., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Early-life adversity and brain development: Is the microbiome a missing piece of the puzzle? *Neuroscience* **342**, 37–54 (2017).

113. Marin, I. A. *et al.* Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. *Sci Rep* **7**, 1–10 (2017).
114. Zhang, Z. *et al.* Prenatal stress leads to deficits in brain development, mood related behaviors and gut microbiota in offspring. *Neurobiol Stress* **15**, (2021).
115. Hassib, L. *et al.* Maternal microbiome disturbance induces deficits in the offspring's behaviors: a systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes* **15**, (2023).
116. Dawson, S. L. *et al.* Maternal prenatal gut microbiota composition predicts child behaviour. *EBioMedicine* **68**, 103400 (2021).
117. Wei, Q. *et al.* Associations of maternal prenatal emotional symptoms with neurodevelopment of children and the neonatal meconium microbiota: A prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology* **142**, 105787 (2022).
118. Tandon, M., Cardeli, E. & Luby, J. Internalizing Disorders in Early Childhood: A Review of Depressive and Anxiety Disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* **18**, 593–610 (2009).
119. Tan, S. & Yip, A. Hans Selye (1907–1982): Founder of the stress theory. *Singapore Med J* **59**, 170–171 (2018).
120. Dranovsky, A. & Hen, R. Hippocampal Neurogenesis: Regulation by Stress and Antidepressants. *Biol Psychiatry* **59**, 1136–1143 (2006).
121. McCutcheon, V. V. Toward an Integration of Social and Biological Research. *Social Service Review* **80**, 159–178 (2006).
122. Malla, A. K., Norman, R. M. G. & Williamson, P. Stability of Positive and Negative Symptoms in Schizophrenia. *The Canadian Journal of Psychiatry* **38**, 617–621 (1993).
123. Fedoce, A. das G. *et al.* The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? *Free Radic Res* **52**, 737–750 (2018).
124. Kendler, K. S., Karkowski, L. M. & Prescott, C. A. Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. *American Journal of Psychiatry* **156**, 837–841 (1999).
125. Lex, C., Bänzner, E. & Meyer, T. D. Does stress play a significant role in bipolar disorder? A meta-analysis. *J Affect Disord* **208**, 298–308 (2017).
126. Corcoran, C., Mujica-Parodi, L., Yale, S., Leitman, D. & Malaspina, D. Could Stress Cause Psychosis in Individuals Vulnerable to Schizophrenia? *CNS Spectr* **7**, 33–42 (2002).
127. Francis, J. L., Moitra, E., Dyck, I. & Keller, M. B. THE IMPACT OF STRESSFUL LIFE EVENTS ON RELAPSE OF GENERALIZED ANXIETY DISORDER. *Depress Anxiety* **29**, 386–391 (2012).
128. Liu, B.-P. *et al.* Stressful life events, insomnia and suicidality in a large sample of Chinese adolescents. *J Affect Disord* **249**, 404–409 (2019).
129. Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 1369–1378 (2012).
130. Collins, S. M., Surette, M. & Bercik, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* **10**, 735–742 (2012).

131. Rhee, S. H., Pothoulakis, C. & Mayer, E. A. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**, 306–314 (2009).
132. Karen, C., Shyu, D. J. H. & Rajan, K. E. Lactobacillus paracasei Supplementation Prevents Early Life Stress-Induced Anxiety and Depressive-Like Behavior in Maternal Separation Model- Possible Involvement of Microbiota-Gut-Brain Axis in Differential Regulation of MicroRNA124a/132 and Glutamate Receptors. *Front Neurosci* **15**, (2021).
133. Burokas, A. *et al.* Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry* **82**, 472–487 (2017).
134. Chevalier, G. *et al.* Effect of gut microbiota on depressive-like behaviors in mice is mediated by the endocannabinoid system. *Nat Commun* **11**, (2020).
135. Luo, Y. *et al.* Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Transl Psychiatry* **8**, (2018).
136. Madison, A. & Kiecolt-Glaser, J. K. Stress, depression, diet, and the gut microbiota: human-bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition. *Curr Opin Behav Sci* **28**, 105–110 (2019).
137. Nishida, K. *et al.* Daily administration of paraprobiotic Lactobacillus gasseri CP2305 ameliorates chronic stress-associated symptoms in Japanese medical students. *J Funct Foods* **36**, 112–121 (2017).
138. Mikocka-Walus, A., Knowles, S. R., Keefer, L. & Graff, L. Controversies Revisited. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 752–762 (2016).
139. Sasmita, A. O. Modification of the gut microbiome to combat neurodegeneration. *Rev Neurosci* (2019) doi:10.1515/revneuro-2019-0005.
140. Bruce-Keller, A. J. *et al.* Maternal obese-type gut microbiota differentially impact cognition, anxiety and compulsive behavior in male and female offspring in mice. *PLoS One* **12**, (2017).
141. Kelly, J. R. *et al.* Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res* **82**, 109–118 (2016).
142. Jašarević, E., Rodgers, A. B. & Bale, T. L. A novel role for maternal stress and microbial transmission in early life programming and neurodevelopment. *Neurobiol Stress* **1**, 81–88 (2015).
143. Katz, R. J., Hersh, S. & And, S. H. *Amitriptyline and Scopolamine in an Animal Model of Depression. Neuroscience & Biobehavioral Reviews* vol. 5 (1981).
144. Monteiro, S. *et al.* An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front Psychiatry* **6**, 1–11 (2015).
145. Willner, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress* **6**, 78–93 (2017).
146. Sterlemann, V. *et al.* Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: Implications for stress-related disorders. *Horm Behav* **53**, 386–394 (2008).

147. Johnson, S. A., Nicolson, S. W. & Jackson, S. The effect of different oral antibiotics on the gastrointestinal microflora of a wild rodent (*Aethomys namaquensis*). doi:10.1016/j.cbpb.2004.06.010.
148. Marín, O. Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. *Nature Medicine* 2016 22:11 **22**, 1229–1238 (2016).
149. Kaphingst, K. A., Persky, S. & Lachance, C. NIH Public Access. **14**, 384–399 (2010).
150. Samuels, B. A. & Hen, R. Novelty-suppressed feeding in the mouse. *Neuromethods* **63**, 107–121 (2011).
151. Walf, A. A. & Frye, C. A. The use of the elevated. *Nih Public Access* **2**, 322–328 (2007).
152. Cryan, J. F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 571–625 (2005).
153. Frisbee, J. C., Brooks, S. D., Stanley, S. C. & d’Audiffret, A. C. An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. *Journal of Visualized Experiments* 1–8 (2015) doi:10.3791/53109.
154. Cathomas, F. *et al.* Oligodendrocyte gene expression is reduced by and influences effects of chronic social stress in mice. *Genes, Brain and Behavior* vol. 18 (2019).
155. Elizalde, N. *et al.* Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: Chronic mild stress and decreased expression of VGLUT1. *J Neurochem* **114**, 1302–1314 (2010).
156. Nishiguchi, M. *et al.* Increases in iPS Transcription Factor (<italic>Oct4</italic>, <italic>Sox2</italic>, <italic>c-Myc</italic>, and <italic>Klf4</italic>) Gene Expression after Modified Electroconvulsive Therapy. *Psychiatry Investig* **12**, 532–537 (2015).
157. Bonanomi, D. *et al.* Phosphorylation of Synapsin I by cAMP-Dependent Protein Kinase Controls Synaptic Vesicle Dynamics in Developing Neurons. *Journal of Neuroscience* **25**, 7299–7308 (2005).
158. Canova, F. & Aparecida de Moraes Ferrari, E. *A importância das proteínas Zenk e Sinapsina I para a memória espacial The importance of Zenk and Synapsin I proteins for spatial memory.* vol. 11 (2015).
159. Pepper, R. E., Pitman, K. A., Cullen, C. L. & Young, K. M. How do cells of the oligodendrocyte lineage affect neuronal circuits to influence motor function, memory and mood? *Front Cell Neurosci* **12**, 1–14 (2018).
160. Silbereis, J. C. *et al.* Olig1 Function Is Required to Repress Dlx1/2 and Interneuron Production in Mammalian Brain. *Neuron* **81**, 574–587 (2014).
161. Zhang, S. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells* **6**, 305 (2014).
162. Pevny, L. H. & Nicolis, S. K. Sox2 roles in neural stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 421–424 (2010).

163. Liu, Y. R. *et al.* Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. *BMC Neurosci* **15**, 1–10 (2014).
164. Nishiguchi, M. *et al.* Increases in iPS transcription factor (Oct4, Sox2, c-Myc, and Klf4) gene expression after modified electroconvulsive therapy. *Psychiatry Investig* **12**, 532–537 (2015).
165. Kretsovali, A. Dissecting the Role of Sox2 in Stemness Regulation and Regenerative Medicine. *J Stem Cell Res Transplant* **4**, (2017).
166. Chapman, J. R. & Waldenström, J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* **10**, e0141853 (2015).
167. Illumina. *IMPORTANT NOTICE This document provides information for an application for 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System.*
168. Vagnerová, K. *et al.* Profiling of adrenal corticosteroids in blood and local tissues of mice during chronic stress. *Sci Rep* **13**, 7278 (2023).
169. Tochitani, S. *et al.* Administration of Non-Absorbable Antibiotics to Pregnant Mice to Perturb the Maternal Gut Microbiota Is Associated with Alterations in Offspring Behavior. *PLoS One* **11**, e0138293 (2016).
170. Asnicar, F. *et al.* Studying Vertical Microbiome Transmission from Mothers to Infants by Strain-Level Metagenomic Profiling. *mSystems* **2**, (2017).
171. Yao, Y. *et al.* The Role of Microbiomes in Pregnant Women and Offspring: Research Progress of Recent Years. *Front Pharmacol* **11**, 1–10 (2020).
172. Thion, M. S. *et al.* Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* **172**, 500-516.e16 (2018).
173. Chin, L. S., Li, L., Ferreira, A., Kosik, K. S. & Greengard, P. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 9230–9234 (1995).
174. Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F. & Benfenati, F. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol* **91**, 313–348 (2010).
175. Mirza, F. J. & Zahid, S. The Role of Synapsins in Neurological Disorders. *Neurosci Bull* **34**, 349–358 (2018).
176. Kang, H. J. *et al.* Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature Medicine* **2012 18:9 18**, 1413–1417 (2012).
177. Arnett, H. A. *et al.* bHLH Transcription Factor Olig1 Is Required to Repair Demyelinated Lesions in the CNS. *Science (1979)* **306**, 2111–2115 (2004).
178. Dai, J., Bercury, K. K., Ahrendsen, J. T. & Macklin, W. B. Olig1 Function Is Required for Oligodendrocyte Differentiation in the Mouse Brain. *Journal of Neuroscience* **35**, 4386–4402 (2015).
179. Kodama, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. & Mori, Y. Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats. *Dev Psychobiol* **50**, 332–342 (2008).

180. Ono, M. *et al.* Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. *Neuroscience* **156**, 1103–1110 (2008).
181. Yang, Y. *et al.* Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cerebral Cortex* **27**, 2871–2884 (2017).
182. Mercurio, S., Serra, L., Pagin, M. & Nicolis, S. K. Deconstructing Sox2 Function in Brain Development and Disease. *Cells* **11**, 1604 (2022).
183. Favaro, R. *et al.* Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* **12**, 1248–1256 (2009).
184. Zhang, B. *et al.* Hyperbaric oxygen improves depression-like behaviors in chronic stress model mice by remodeling gut microbiota and regulating host metabolism. *CNS Neurosci Ther* **29**, 239–255 (2023).
185. O'Brien, S. J. The consequences of Campylobacter infection. *Curr Opin Gastroenterol* **33**, 14–20 (2017).
186. Wang, Y. *et al.* Gut microbiota is involved in the antidepressant-like effect of (S)-norketamine in an inflammation model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* **207**, 173226 (2021).
187. Medina-Rodriguez, E. M., Watson, J., Reyes, J., Trivedi, M. & Beurel, E. Th17 cells sense microbiome to promote depressive-like behaviors. *Microbiome* **11**, 92 (2023).
188. Ilinskaya, O. N., Ulyanova, V. V., Yarullina, D. R. & Gataullin, I. G. Secretome of Intestinal Bacilli: A Natural Guard against Pathologies. *Front Microbiol* **8**, (2017).
189. Vanhoutte, T., Huys, G., Brandt, E. & Swings, J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* **48**, 437–446 (2004).
190. Walter, J. *et al.* Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, and Weissella Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2578–2585 (2001).
191. Qiu, X., Wu, G., Wang, L., Tan, Y. & Song, Z. Lactobacillus delbrueckii alleviates depression-like behavior through inhibiting toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in mice. *Ann Transl Med* **9**, 366–366 (2021).
192. Liang, S. *et al.* Administration of Lactobacillus helveticus NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* **310**, 561–577 (2015).
193. Xie, R. *et al.* Oral treatment with Lactobacillus reuteri attenuates depressive-like behaviors and serotonin metabolism alterations induced by chronic social defeat stress. *J Psychiatr Res* **122**, 70–78 (2020).
194. Markowiak-Kopeć, P. & Śliżewska, K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients* **12**, 1107 (2020).
195. Tang, C.-F. *et al.* Short-Chain Fatty Acids Ameliorate Depressive-like Behaviors of High Fructose-Fed Mice by Rescuing Hippocampal Neurogenesis Decline and Blood–Brain Barrier Damage. *Nutrients* **14**, 1882 (2022).

196. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, (2020).
197. Ziats, M. N., Grosvenor, L. P. & Rennert, O. M. Functional genomics of human brain development and implications for autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry 2015 5:10* **5**, e665–e665 (2015).
198. Liscovitch, N. & Chechik, G. Specialization of Gene Expression during Mouse Brain Development. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003185 (2013).
199. Ziats, M. N., Grosvenor, L. P. & Rennert, O. M. Functional genomics of human brain development and implications for autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry 2015 5:10* **5**, e665–e665 (2015).
200. Kimura, I. *et al.* Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice. *Science (1979)* **367**, (2020).
201. Kim, Y. S., Unno, T., Kim, B.-Y. & Park, M.-S. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J Mens Health* **38**, 48 (2020).
202. Zhang, X. *et al.* Sex- and age-related trajectories of the adult human gut microbiota shared across populations of different ethnicities. *Nat Aging* **1**, 87–100 (2021).
203. Volkova, A. *et al.* Effects of early-life penicillin exposure on the gut microbiome and frontal cortex and amygdala gene expression. *iScience* **24**, 102797 (2021).
204. Kayyal, M. *et al.* Sex dependent effects of post-natal penicillin on brain, behavior and immune regulation are prevented by concurrent probiotic treatment. *Sci Rep* **10**, (2020).
205. Shultz, S., Klin, A. & Jones, W. Neonatal Transitions in Social Behavior and Their Implications for Autism. *Trends Cogn Sci* **22**, 452–469 (2018).

ANEXO A

GUT MICROBES
2023, VOL. 15, NO. 1, 2226282
<https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2226282>



REVIEW

OPEN ACCESS

Maternal microbiome disturbance induces deficits in the offspring's behaviors: a systematic review and meta-analysis

Lucas Hassib^{a,b}, Cilene Lino de Oliveira^c, Guilherme Araujo Rouvier^{a,d}, Alexandre Kanashiro^e, Francisco Silveira Guimarães^f, and Frederico Rogério Ferreira^{a,b}

^aOswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; ^bDepartment of Mental Health, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^cDepartment of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ^dFederal Institute of Education, Science, and Technology of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ^eDepartment of Dermatology, Medical Sciences Center, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA; ^fDepartment of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ABSTRACT

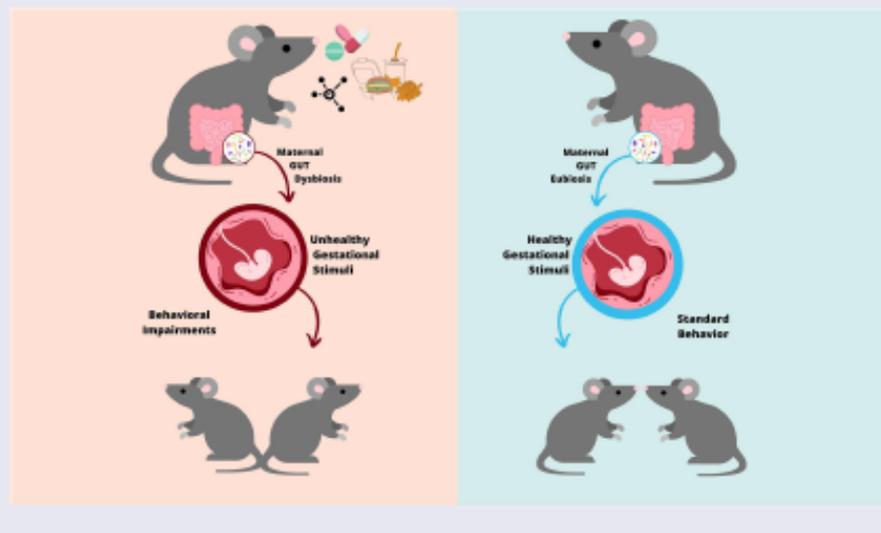
Recent evidence has suggested that changes in maternal gut microbiota in early life may generate neurobiological consequences associated with psychiatric-related abnormalities. However, the number of studies on humans investigating this problem is limited, and preclinical findings sometimes conflict. Therefore, we run a meta-analysis to examine whether maternal microbiota disturbance (MMD) during neurodevelopment might affect the offspring during adulthood. We found thirteen studies, from a set of 459 records selected by strategy registered on PROSPERO (#289224), to target preclinical studies that evaluated the behavioral outcomes of the rodents generated by dams submitted to perinatal enteric microbiota perturbation. The analysis revealed a significant effect size (SMD = -0.51, 95% CI = -0.79 to -0.22, $p < .001$, $T_2 = 0.54$, $I_2 = 79.85\%$), indicating that MMD might provoke behavioral impairments in the adult offspring. The MMD also induces a significant effect size for the reduction of the sociability behavior (SMD = -0.63, 95% CI = -1.18 to -0.07, $p = 0.011$, $T_2 = 0.30$, $I_2 = 76.11\%$) and obsessive-compulsive-like behavior (SMD = -0.68, 95% CI = -0.01 to -1.36, $p = 0.009$, $T_2 = 0.25$, $I_2 = 62.82\%$) parameters. The effect size was not significant or inconclusive for memory and anxiety-like behavior, or inconclusive for schizophrenia-like and depressive-like behavior. Therefore, experimental perinatal MMD is vertically transmitted to the offspring, negatively impacting behavioral parameters related to psychiatric disorders.

ARTICLE HISTORY

Received 30 August 2022
Revised 26 May 2023
Accepted 8 June 2023

KEYWORDS

Maternal microbiome disturbance; neurodevelopment; gut-brain axis; psychiatric disorder; sociability; autism spectrum disorder



CONTACT Frederico Rogério Ferreira frederico.ferreira@ioc.fiocruz.br Laboratory of Cardiovascular Investigation, Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Osório de Almeida Pavillon, room 14A. Av. Brasil, 4365, Mangunhos, Rio de Janeiro, RJ CEP: 21040-360, Brazil

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2226282>

© 2023 Oswaldo Cruz Foundation. Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

1. Introduction

Although the knowledge of the existence of microorganisms and their involvement in diseases begins at 15th century with the germ theory by Girolamo Fracastoro and Marcus von Plenciz, chinese medicine from the 4th century already used the Yellow Soups as a rudimentary microbiota transplantation method for treating intestinal disease.¹ However, with recent advances in techniques for genome sequencing that allowed a deep uncovering of microbe species and variabilities,² accumulated data reveal the influence of the gut microbiota on several human physiological processes, such as the sensitization and balance of the immune system³, hormone production,⁴ aging,⁵ and metabolism.⁶

Therefore, Sudo and colleagues⁷ provided evidence for the interplay between enteric microbiota and stress responses coordinated by the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. They reveal an exacerbated curve of serum glucocorticoids released after stress exposure in animal germ-free (GF) compared with the specific pathogen-free (SPF) group. Interestingly, they also highlighted that those responses of the HPA axis are normalized as GF animals are colonized with a commensal bacteria *Bifidobacterium infantis*. However, the regenerative effects of gut colonization are only observed as they occur in juvenile animals, before completing the neural maturation. Therefore, these findings already suggest the presence of a mechanism by which the gut microbiota could modulate the HPA stress response during neurodevelopment.⁸ Since then, the bidirectional interplay between host intestinal commensal bacteria and central nervous system (CNS) superior functions, such as emotion,⁹ effectiveness,¹⁰ sociability,¹¹ and cognition¹² have attracted attention. The gut-brain axis (GBA) promotes a complex bidirectional communication between gut commensal bacteria, the immune system, the enteric nervous system, and the neural system, commanding activities responsible for brain development, health, and disease.^{13,14}

The role of GBA in brain development and maturation from gestational phases to adulthood neurological outcomes has been revealed in both clinical^{15,16} and preclinical studies.¹⁷ With different approaches, studies have highlighted the hypothesis

that neurodevelopmental dysfunction induced by maternal microbiota disturbance (MMD) may result in psychiatric disorders, such as autism spectrum disorder (ASD),¹⁸ multiple sclerosis,¹⁹ generalized anxiety (GA),²⁰ and schizophrenia (SZ).²¹

Although consistent results describe the neural mechanisms involving the microbiome to CNS functions, collectively, the evidence is sometimes conflicting or inconclusive.²² Methodological limitations of long-term follow-up of patient cohorts from pregnancy to adulthood may explain the limited number of studies and unsatisfying results.²³ Furthermore, differences in the experimental protocols, such as the microbiota manipulation technique chosen, different behavioral analysis paradigms, and the distinct methods applied for microbiota sampling and analysis add high variability, which can result in a disagreement between preclinical studies.^{24–26} For instance, several studies using microbiota manipulation, such as diet, chemical agents, probiotics, prebiotics, or symbiotics have shown differences in the impact on bacterial populations, with divergent effects on the host outcomes.^{27,28} Therefore, we run over the current literature aimed at investigating whether MMD during the embryonic developmental window might impact the behavioral outcomes of offspring during adulthood life. To achieve this goal, we performed a systematic review with meta-analysis to combine the results of behavioral tests of the offspring generated by dams submitted to enteric microbiota perturbation during pregnancy.

2. Methods

2.1. Literature search

This study is registered to PROSPERO (#289224) and was reported according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines,²⁹ and the recommendations for carrying out meta-analyses.³⁰ A searchable review question was structured using the PICO tool as follows: Population = laboratory rodents; Intervention = treatment of female progenitors during the pregnancy antibiotic, probiotic, prebiotic, symbiotic, microbiota colonization, microbiota transferring, and diet manipulation in any dose, via or time of

administration; Control = treatment of female progenitors during the pregnancy with vehicle or saline or non-treated with intervention; Outcome = behavioral outcome of the offspring in the infancy, youth, or adulthood in relevant behavioral tests. The analyzed behaviors were those aiming to investigate depressive and anxiety-like behaviors, social deficits, cognition alterations, schizophrenic, panic, and obsessive-compulsive behaviors. A systematic computerized literature search of PubMed, EMBASE, and Web of Science was conducted to target original articles that investigate the effect of maternal microbiota perturbations on offspring behavioral outcomes using the search strategy design described in (Supplementary Table S1).

2.2. Eligibility criteria and screening

Rodent pre-clinical studies in any language, any date, and any journal were included if they aimed to experimentally manipulate maternal microbiota during pregnancy or until weaning and performed a behavioral analysis on offspring in adulthood. There were no studies with a protocol of MMD before gestation. The MMD window was selected due to previous clinical and preclinical evidence showing that the first offspring microbiome is mainly formed by maternal vertical transmission.^{31,32} The following inclusion criteria were applied to the screening of the relevant studies: (1) used adult laboratory rodents (rats or mice) of any sex and strain; (2) altered the maternal gestational microbiota through the use of antibiotics, probiotics, prebiotics or symbiotics, microbiota transfer, or dietary manipulations with caloric changes, fiber consumption, or ingestion of environmental contaminants; (3) characterized maternal microbiota profile; (4) the control group did not undergo any manipulation of the microbiota; (5) performed the relevant behavioral tests in the offspring older than 21 days. The following behavioral tests were eligible: Forced swimming test; Tail suspension test; Learned helplessness; Novelty suppressed feeding test; Sucrose spray test; Sucrose preference; Social default test; Elevated plus maze test; Vogel conflict test; Open field test; Light dark box; Elevated zero maze; Three chamber social interaction test; Three chamber social interaction test; Social interaction; Ultrasonic vocalization; Water maze

test; Novel object recognition test; T test; Marble burying; Prepulse inhibition; Barnes maze test; and Y maze test.

Studies were excluded if they (1) were reviews, systematic reviews, or meta-analyses; (2) did not manipulate the maternal microbiota during pregnancy; (3) did not characterize the maternal microbiota; (4) performed the maternal microbiota manipulation by using behavioral or environmental stress, maternal immune-stimulating, and immune-suppressors; (5) conduct a co-treatment with two or more intervention factors; (6) performed no relevant behavioral study in the offspring of the experimental dams. Four reviewers (F.F., L.H., G.R., and A.K.) independently screened all titles and abstracts before full-text retrieval. The full texts of potentially eligible articles were assessed independently by at least two reviewers, and discrepancies were resolved through debate and consensus of the four authors for the final decision.

2.3. Assessment of study quality

Two independent reviewers (L.H. and G.R.) evaluated the risk of bias using the RoB Syrcle tools³³, which assess general aspects of experimental design and more specific features of animal research. In case of disagreement between the authors in some aspects of the evaluation, a third reviewer (F.F.) was consulted to make the final decision (Supplementary Table S2).

2.4. Data extraction, global, and stratified meta-analysis

Qualitative information was extracted by reviewers (F.F., L.H., G.R., and A.K.) using a predefined data extraction sheet (Supplementary Table S3), with the following items: article DOI, year of publication, experimental animal (species, age, and sex), microbiota manipulation technique, behavioral analysis conducted in the offspring, type of outcome measure and statistics [unity, mean, standard error, and sample size (n)]. When sample sizes were reported as intervals, the average between the numbers was used as the sample size (e.g., when 6–12 animals per group were reported, the sample size was considered as 9 animals per group).

For each primary outcome, a standardized mean difference (SMD) was calculated per study. Studies were stratified according to the theoretical paradigm (social behavior, memory, anxiety, depressive, schizophrenic, or obsessive-compulsive behavior) for subgroup meta-analysis independent of the features of the population, intervention, control, or outcomes. When feasible (at least two studies per subgroup), the meta-analyses were performed using a random effect model to estimate the combined effect size (CES, Hedges'g) with 95% confidence interval (95% CI), publication bias (Forest plot, Trim-and-Fill), and Heterogeneity (I², Q statistic and the associated p-value, alpha = 0.05).

The combined effect size for all measures was calculated normalizing by behavioral impairment or standard behavioral, according to the outcome of the animal task. Therefore, a negative effect size was observed when treatments reduced the probability of exhibition of that particular activity (M_{tt}d = mean of the treated group) compared to the control group (M_{ct}l = mean of the treated group), resulting in a negative value (M_{tt}d - M_{ct}l < 0). For example, it was considered behavioral impairment the reduction of open arm exploration time in the Elevated Plus Maze test (interpreted as anxiety-like behavior), the reduction in the distance moved in the target quadrant in the Morris Water Maze (interpreted as memory impairment), the reduction in sugar consumption in the Sucrose Preference test (interpreted as anhedonia-like behavior), or the reduction in sociability time in the Three Chamber test (interpreted as social deficits). When the behavioral impairment results in an increase in the probability of a particular activity, such as the increase in buried marbles in the Marble Burying test (interpreted as stereotyped behavior), or increased latency to find the target hole in Barnes Maze (interpreted as memory impairments), compared to the control group, the size effect result (M_{tt}d - M_{ct}l) was multiplying by -1, as provided at the raw data (Supplementary table S3).

Calculations and figures were prepared using the Software Meta-essentials by Suurmond, van Rhee, and Hak³⁴ (www.erim.eur.nl/research-support/meta-essentials/downloads). In the case of studies applying two or more behavioral tests to the same

cohort of animals, one of them was randomly selected to be analyzed.

The combined effect sizes (CES) Hedges'g were categorized as very small (SMD = up to 0.2), small (SMD = between 0.2 and 0.5), moderate (SMD = 0.5–0.8), and large (SMD higher than 0.8).³⁵ The values of I² ranging from 0% to 100%, indicate proportion of heterogeneity interpreted as low to up to 25%, moderate in between 25% and 75% or high for above 75%. The 95% confidence interval (95% CI) excluding the null was considered significant or conclusive while 95% CI including the null was considered inconclusive. P-values lower than alpha (< .05) were interpreted as conclusive.

3. Results

3.1. Search result

From a total of 459 records identified in the database-searching strategy, 331 had the title and abstract screened after removing 128 duplicates (Figure 1). Fourteen articles fulfilled the eligibility criteria. After a full text examination, the two articles were excluded as they did not match the inclusion criteria.^{36,37} One eligible article found by a manual search was included.³⁸ A total of 13 publications and 21 studies, reporting at least 1129 animals, were included in this review: Afroz et al., 2021;³⁹ Bruce-Keller et al., 2017;²⁰ Buffington et al., 2016;⁴⁰ Champagne-Jorgensen et al., 2020;⁴¹ Hill et al., 2021;⁴² Lebovitz et al., 2019;¹¹ Lyu et al., 2021;²⁸ Sanguinetti et al., 2019;⁴³ Tochitani et al., 2016;²⁷ Vuong et al., 2020;⁴⁴ Xiao et al., 2020;⁴⁵ Yu et al., 2020;⁴⁶ Leclercq et al., 2017.³⁸

3.2. Description of the eligible articles

The characteristics of the selected articles are presented in Table 1. Most of the articles included in the present work used C57BL/6N (N = 9)^{11,20,27,28,39,40,42,44,46} mice as animal models. However, other rodent models were used, such as BALB/c (N = 2)^{38,41} and B6129SF2/J (N = 1) mice⁴³ and Sprague-Dawley rats (N = 1).⁴⁵

Although most studies have split males and females into independent groups,^{11,20,27,28,38–42,45} some have not differentiated between the sexes.^{43,46} In this case, the animals were considered

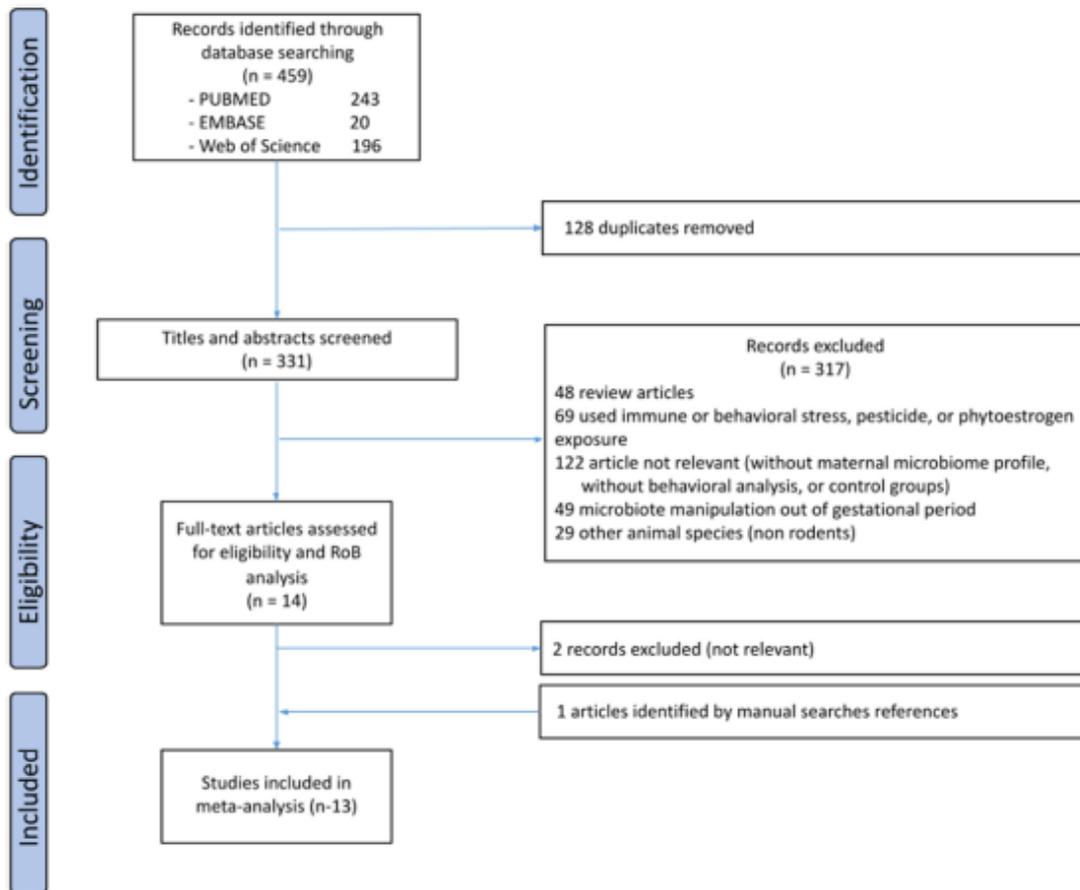


Figure 1. PRISMA flow diagram of the study.

to have non-defined sex. As defined in the inclusion criteria, only animals tested from 21 days onwards were included in this meta-analysis. Thus, the animals underwent behavioral tests between an average of 3 and 14 weeks.

The majority of included articles used antibiotics^{11,27,38,41,44,46} or diet manipulation^{39,40,43,46} as the experimental approach for maternal microbiota perturbation, followed by environmental contaminant by silver²⁸ and lead⁴⁵ and fecal transplantation²⁰ (Figure 2a). Manipulations in the different selected articles that occurred during pregnancy and could also include the breastfeeding period, encompassing the perinatal period. The 16s V4 DNA sequencing method for microbiome characterization was used for 11 articles,^{11,20,27,28,34–44} one used shotgun

metagenomic,²⁸ and one used bacterial culture¹¹ (Figure 2b).

The eligible articles used the following outcome measures of behavioral analyses: (1) Open field: inner zone locomotor activity, time spent in the inner zone, or the number of entries in the inner zone; (2) Elevated plus maze (EPM): open arm exploration time (OAE), head dipping; (3) Three Chamber: sociability (score), time spent with social novelty, time in social chamber; (4) Ultrasonic vocalization (UV): vocalizing time; (5) Reciprocal social interaction (RSI): interaction frequency; (6) Barnes Maze (BM): latency to find the target; (7) Y maze (YM): alternation triplets; (8) Morris water maze (MWM): distance traveled in the target quadrant; (9) Marble burying (MB): number of buried marbles; (10) Prepulse inhibition test (PPI):

Table 1. Characteristics of the articles included in the present study.

Reference (author and year)	Behavioral paradigm	Experimental manipulation	Animal	Mean age (weeks)	Sex	Sample size	Behavior assessments
Lebovitz, 2019	Sociability	Antibiotic	C57BL/6N	3	ND	86	Three Chamber
Bruce-Keller, 2017		Fecal Transplantation	C57BL/6N	10	M; F	60	Ultrasonic vocalization
Tochitani, 2016	OCD	Antibiotic	C57BL/6N	12	M	29	Social Interaction
Buffington, 2016		High-fat diet	C57BL/6N	10	M	32	Social Interaction
Jorgensen, 2019		Antibiotic	BALB/c	6	M; F	59	Three Chamber
Leclercq, 2017		Antibiotic	BALB/c	6	M; F	51	Three Chamber
Afroz, 2021		High-salt diet	C57BL/6N	9	M; F	52	Three Chamber
Bruce-Keller, 2017		Fecal Transplantation	C57BL/6N	10	M; F	60	Marble burying
Buffington, 2016		High-fat diet	C57BL/6N	10	M	32	Marble burying
Afroz, 2021		High-salt diet	C57BL/6N	9	M; F	52	Marble burying
Lyu, 2021		Silver nanoparticle	C57BL/6N	11	ND	23	Elevated plus maze
Vuong, 2020		Antibiotic	C57BL/6N	8	ND	70	Prepulse inhibition
Bruce-Keller, 2017	Anxiety	Fecal transplantation	C57BL/6N	10	M; F	60	Open field
Tochitani, 2016		Antibiotic	C57BL/6N	12	M	79	Open field
Buffington, 2016	Depression	High-fat diet	C57BL/6N	10	M	32	Open field
Jorgensen, 2019		Antibiotic	BALB/c	6	M; F	59	Elevated plus maze
Yu, 2020		Low-fiber diet	C57BL/6N	6	ND	34	Elevated plus maze
Lyu, 2021		Silver nanoparticle	C57BL/6N	11	ND	23	Elevated plus maze
Hill, 2021		Antibiotic	C57BL/6N	7	M; F	20	Open field
Leclercq, 2017		Antibiotic	BALB/c	6	M; F	51	Elevated plus maze
Bruce-Keller, 2017		Fecal transplantation	C57BL/6N	10	M; F	60	Sucrose preference
Yu, 2020		Low-fiber diet	C57BL/6N	6	ND	34	Barnes Maze
Sanguinetti, 2019		High-fat diet	B6129SF2/J	14	ND	45	Y maze
Lyu, 2021		Silver nanoparticle	C57BL/6N	11	ND	23	Barnes Maze
Xiao, 2020	Memory	Lead acetate	Sprague-Dawley	8	M	20	Morris Water Maze

OCD: obsessive-compulsive disorder; ND: non-defined; M: male; F: female.

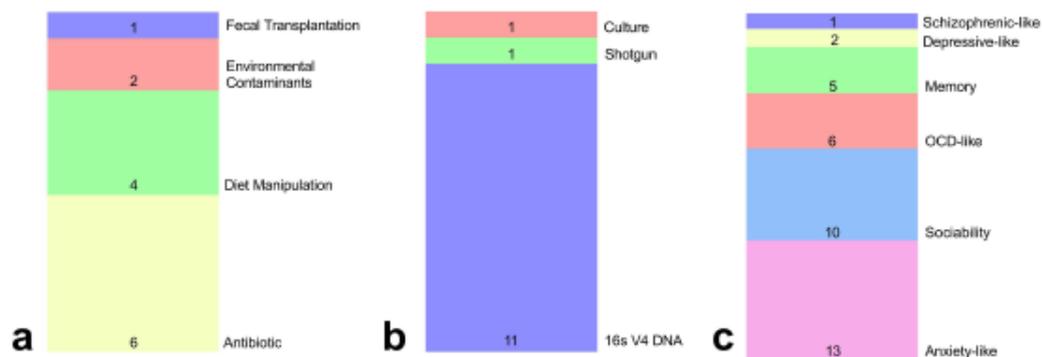


Figure 2. Descriptive analysis of the articles included in the present study. (a) The methodology used to manipulate the maternal gestational microbiota. (b) The method used to characterize the maternal gestational microbiota. (c) Behavioral paradigm analyzed.

prepulse inhibition; (11) Sucrose preference test (SP): volume consumption.

Thirteen independent groups of animals from the selected articles evaluated anxiety-related behavior, through Open Field^{20,27,40,42} or Elevated Plus Maze tests;^{28,38,41,46} ten accessed social deficits behaviors using Three Chamber,^{11,38,39,41} Ultrasonic Vocalization,²⁰ or Reciprocal Social Interaction tests;^{27,40} six evaluated obsessive-compulsive behavior using Marble Burying test^{20,39,40} or Stereotyped Self-grooming;²⁸ five surveyed memory through Barnes Maze,^{28,46} Y Maze,⁴³ or Morris Water Maze;⁴⁵ two

assessed Depressive-like behavior applying Sucrose Preference test;²⁰ and one investigated Schizophrenia using prepulse Inhibition test⁴⁴ (Figure 2c).

3.3. Assessment of study quality

The Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) risk of bias (RoB) tool was used to assess the risk of bias in the included animal studies. The risk of bias was low for most of the studies, as described in Supplementary Table S2.

3.4. Global meta-analysis: CESs of maternal enteric microbiome disruption on offspring behavioral outcomes

The analysis combined of all thirty-five behavior outcomes revealed a significant effect size (SMD = -0.51,

95% CI = -0.79 to -0.22, $p < .001$) indicating that MMD provokes behavioral impairments in the adult offspring (Figure 3). According to Hedges' g criteria, the effect size for the preset collection of data was moderate and associated with high heterogeneity ($T^2 = 0.54$, $I^2 = 79.85\%$).

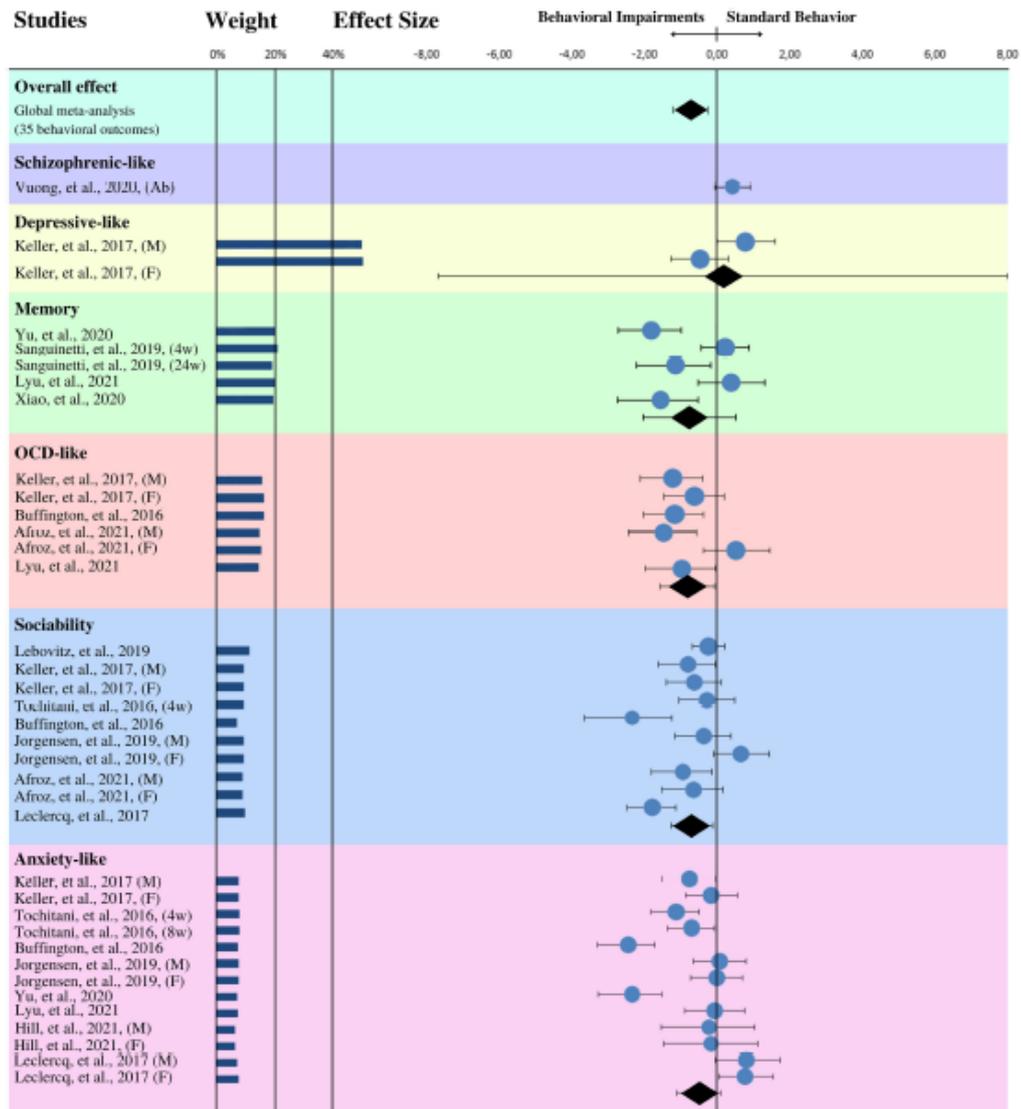


Figure 3. Forest plot graph of the effects of MMD on offspring behavior. M: males; F: females; Ab: Antibiotic; Gf: Germ-free. Only independent groups from the same study were used.

3.5. Stratified meta-analysis: CESs of maternal enteric microbiome disruption on offspring memory, and social, anxiety-like, depressive-like, schizophrenic-type, and obsessive-compulsive behaviors

The estimated CES in the meta-analysis stratified by each outcome reveals that MMD is significantly associated with reduction of sociability behavior (SMD = -0.63, 95% CI = -1.18 to -0.07, $p = 0.011$, $T2 = 0.30$, $I2 = 76.11\%$), and obsessive-compulsive-like behavior (SMD = -0.68, 95% CI = -0.01 to -1.36, $p = 0.009$, $T2 = 0.25$, $I2 = 62.82\%$). According to Hedges'g criteria, the effect size for all stratified behaviors was moderate and associated with moderate heterogeneity (Figure 3).

The CESs were moderate and not significant statistically in the studies investigating anxiety-like behavior (SMD = -0.45, 95% CI = -1.07 to 0.17, $p = 0.113$, $T2 = 0.83$, $I2 = 84.42\%$) and memory (SMD = -0.67, 95% CI = -1.85 to 0.50, $p = 0.111$, $T2 = 0.79$, $I2 = 83.41\%$), and very small in depressive-like behaviors, also not significant statistically (SMD = 0.16, 95% CI = -7.16 to 7.46, $p = 0.784$, $T2 = 0.53$, $I2 = 80.09\%$), both with high heterogeneity. As only one experimental group for schizophrenia-like behavior was found in the literature that fulfilled our inclusion criteria, it was not possible to perform a meta-analysis for this model (Figure 3).

4. Discussion

In the last decade, the maternal microbiota has received remarkable attention due to its interference with brain development, resulting in long-lasting effects on the offspring.^{17,45} According to the developmental origins of health and disease hypothesis,⁴⁶ during the perinatal period, the development and maturation of several body regulatory systems, such as immune, endocrine, and neural systems, occurs with particular susceptibility to environmental factors.⁴⁷⁻⁴⁹ However, there is still a limited number of clinical studies investigating the role of the maternal enteric microbiome in infant neurodevelopment. Moreover, so far as we know, no study has directly investigated the effects of maternal dysbiosis on offspring's behavior. Most protocols

have used the GF animals or antibiotic, pre-, or probiotic treatments for microbiota manipulation. The present meta-analysis investigated whether the disturbance of maternal enteric microbiota would be associated with behavioral abnormalities manifested by the offspring during adult life. We assess this hypothesis by reviewing thirteen eligible, from a set of 459 rodent preclinical studies, identified using a search strategy to determine offspring's behavioral outcomes generated in MMD protocol.

One of the eligibility criteria requests the confirmation of disturbance of maternal enteric microbiota by at least one validated method. Only one article used growth culture media characterize the microbiota profile, while the other twelve used culture-independent methods. Among them, one study used the shotgun method, and eleven characterized the maternal microbiota by using the 16s metagenomics method.⁵⁰ The metagenomic methods allow the characterization of a greater number of microorganisms and the processing of significant amounts of data than culture-dependent methods.⁵¹ The cost decrease observed in recent decades, especially to 16s metagenomics, explains the exponential number of studies in the field. Although the search strategy included other species as non-human primates, only studies with rodents matched all the criteria. Nine in thirteen studies used mice of the C57BL/6N strain as rodent models, three used other mouse strains (BALB/c and B6129SF2/J), and only one used rats (Sprague-Dawley).

This variability in species/strain may have contributed to the heterogeneity of the meta-analysis. Even though most studies have used GF compared to SPF animals, or protocols for microbiota recolonization of GF animals, the present meta-analysis did not include studies with GF protocols because this condition has been associated with several behavioral and neurodevelopmental abnormalities, and they have not been considered clinically relevant models because its weakness in causality.⁵²

In the present meta-analysis, the combined effects for behavioral outcomes to animal models of major depression disorder, memory, obsessive-compulsive disorder, sociability impairments, and generalized anxiety reveal that MMD might negatively impact the expression of offspring's behavior

during adult life. The meta-analysis stratified for sociability outcomes confirmed a significant impact of MMD on the offspring's behavior. This finding corroborates other studies showing that maternal microbiota might influence the social behavior of the offspring, being associated with increasing the risk of neurodevelopmental disorders including ASD.^{18,53,54} For instance, Bruce-Keller et al. demonstrated in 2017 that microbiota transplantation from animals submitted to the High Fat Diet (HFD) to pregnant females decreased the sociability of offspring in both males and females.²⁰ Although this study did not investigate the neural mechanism, it suggested that a healthy maternal microbiota is important for the offspring's social behavioral development. Lastly, Afroz et al.³⁹ also observed that a high-salt diet during pregnancy reduced the maternal *Lactobacillus* population, which was related to lower sociability in the offspring, both in males and females.

Social impairments were also observed in studies that used small doses of antibiotics as models of MMD, an approach close to what is observed clinically. Jorgensen and colleagues demonstrated that even low levels of penicillin exposure can lead to social impairments only in male rodents. These behavioral alterations were correlated with brain AVPR1A, AVPR1B, and OXTR altered expression, and decreased balance of splenic FOXP3+ regulatory T cells.^{38,41} Prenatal penicillin exposure also led to distinct microbiota compositions clustered differently by sex.⁴¹ His team continued Leclercq et al.'s work, which in 2017 had already shown that small doses of penicillin during pregnancy and the perinatal period caused deficits in the animal's sociability.³⁸ Regardless of gender, and an increased AVPR1b expression in the prefrontal cortex of both sexes, but not in the hippocampus. This gene encodes a receptor for vasopressin, important for arginine-vasopressin signaling, and is related to the aggressive behavior of offspring.⁵⁵ The group also observed a systemic increase in pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6, IL-10, and CXCL15, in the animals' prefrontal cortex, but without systemic changes.

After that, different studies analyzed brain impairments that could explain the effects of MMD, causing social disabilities in offspring. As

observed by Lebovitz et al., one of the mechanisms by which a model of antibiotic-based bacterial depletion in maternal microbiota impairs the proper offspring neurobehavioral development is due to an accentuated prefrontal cortex microglial expression of Cx3cr1, a chemokine receptor for neuron-derived Cx3cl1 (fractalkine). This signaling pathway involves premature senescence of microglia and dysfunctional remodeling of synapses, leading to deficits in the social preference in males and females during the three-chamber test, which can be rescued by *Lactobacillus murinus* HU-1 or Cx3cr1 Knockout11.

Buffington and colleagues also explored the role of the *Limosilactobacillus* genus on mechanisms of social deficits induced by dysbiosis⁴⁰. The group observed that pups of females that submitted to MMD showed social deficits related to lower long-term potentiation (LTP) in the ventral tegmental area (VTA) in dopaminergic neurons during social stimuli, and has a reduction in hypothalamic oxytocinergic neurons when compared to the pups generated in female control. Treating these pups with *L. reuteri* restores the number of hypothalamic oxytocinergic neurons, which reestablish LTP in the VTA and, consequently, improves the sociability of the animals.

Finally, the study conducted by Tochitani et al. did not observe social impairments in male mice.²⁷ In that work, behavioral analysis was performed on the offspring of females submitted to MMD during pregnancy at four and eight weeks of life. However, the authors report that animals exhibit locomotor impairments at week four, which could be a confounding factor for the sociability test. Also, social behavior was not evaluated at week eight, when the animal no longer showed locomotor impairments. Taken together, these studies accumulate evidence that MMD modulates social behavior in the offspring and highlight the role of the *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, and *Limosilactobacillus* genus in sustaining a healthy microbiota for sociability in adult life.^{11,20,27,38-41}

The CES stratified analysis also demonstrated that MMD increases the stereotypical behavior of the offspring. Stereotypical behaviors are symptoms of different disorders such as OCD, ASD⁵⁶ and SZ,⁵⁷ characterized by repetitive, functionless motor behavior.⁵⁷ Stereotyped behavior seems to

be related mainly to excessive dopaminergic activity in the basal ganglia,⁵⁸ which is influenced by the gut microbiota. One of the gold standard models for studying this behavior in mice, with great validity and easy implementation, is the MB test.⁵⁹ All three studies performed the test on males found that MMD elicits stereotyped behaviors in the offspring.^{20,39,40} Of these, only two also performed in females,^{20,39} which did not show significant differences from the control group. In addition to the MB test, another way to analyze stereotyped behaviors is through the quantification of unnecessary and exacerbated compulsive behaviors in mice, such as excessive grooming,²⁸ increased chewing of non-nutritive kaolin clay,⁶⁰ and excessive head-dipping behaviors.⁶⁰ In the study by Lyu and collaborators, mice that underwent MMD through exposure to AgNP spent more time engaged in stereotypic head-dipping behaviors compared to controls.²⁸ Together these results suggest that MMD might have a sex-dependent effect for offspring's stereotyped behaviors, corroborating the neurodevelopmental hypothesis for ASD.⁶¹

Regarding the other behaviors analyzed, it has already been demonstrated that colonization of healthy mice with fecal microbiota provided by donor mice subjected to stress protocols is sufficient to reproduce the stress-related behavior, including anxiety and depressive-like behaviors, in the recipient mice.⁶² In addition, Schmidt et al. have shown that FMT from healthy adult rats prevented both gut dysbiosis and anxiety-like behaviors development in those animals suffering spinal cord injury.⁶³ Moreover, previous studies also have shown that adult GF animals exhibit a constitutive reduction of anxiety-related behaviors compared to SPF animals.⁶⁴ This anxiolytic-like response of GF animals also occurs when they are exposed to stress,⁶⁵ and it is reversed when mice receive microbiota of healthy SPF animals via FMT.⁶⁵ Although all these pieces of evidence suggest that gut microbiota participants in anxiety-like responses, we found a marginal combined size effect of the MMD on offspring anxiety-like behavior in the present data set. However, we apply a meta-analysis for adult mice undergoing maternal enteric dysbiosis, a protocol different from the results above. Moreover, several animal models that explore anxiety-related behavior are susceptible to

other environmental stress.⁶⁶ Thus, studies aimed to assess the effects of MDD on offspring behavior could have been contaminated by confounding factors.

The same occurs with the CES for memory-related behaviors. D'Amato and coworkers have shown that transplantation of the microbiota from aged mice to adult mice affects spatial learning and memory via modulation of hippocampal synaptic plasticity.⁶⁷ A sharp decrease in bacteria associated with the production of short-chain fatty acids (SCFAs) (Lachnospiraceae, Faecalibaculum, and Ruminococcaceae) was observed in the transplanted mice. Also, using transplantation techniques, the microbiota of a rodent model of Alzheimer's disease for C57BL/6 mice decreased neurogenesis in the adult hippocampus and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) expression, and increased p21 expression, leading to memory impairment.⁶⁸ However, the results of stratified CES in the present study showed no effect of MMD on offspring memory, suggesting that these changes observed in adult animals, at least for the present collection of data, may not be related to MMD. Regarding behaviors related to depression and schizophrenia, the number of results obtained in the present data collection does not permit conclusions so far, and further studies are needed.

GBA is one of the most complex communication systems evolving immunological, endocrine, metabolic, and neural pathways.^{69–75} However, the mechanism whereby environmental factors during the perinatal-phase compromise the GBA and cause negative consequences to neural development remains to be elucidated.^{76–78}

Dietary habits have been shown a consistent and reproducible factor in shaping the composition of the gut microbiome,⁷⁹ leading to impairments in memory, exploration, and social behavior in adulthood in rodents.^{40,43} Different diets provide different nutrients that can select the composition of the microbiota, as shown in clinical⁸⁰ and preclinical⁸¹ studies. In addition, various components of the maternal diet play beneficial roles in mental health depending on the gut microbiome.⁸² For example, inulin is a soluble fiber that cannot be digested by the body,⁸³ but is metabolized by enteric microbiota, leading to the production of SCFAs.⁸⁴ Several studies have reported that diet-induced

MMD, e.g., inadequate dietary fiber or excessive consumption of high-fat or high-salt foods, disrupt the gut microbiota of the offspring⁸⁵ and also modify the production of maternal gut metabolites that can cross the placenta and the embryo blood–brain barrier (BBB).⁸⁶ Both have been associated with neurodegenerative diseases and behavioral disorders.⁸⁷ In addition, transplantation of the HFD gut microbiota into female mice before breeding can disrupt social behavior in males, but not in females and offspring.²⁰ This study adds to evidence that behavioral impairments induced by HFD may be vertically transmitted to the offspring through the microbiota in a sex-specific manner.

Another way to trigger MMD applied in the studies included in the present meta-analysis was the consumption of environmental contaminants, such as silver and lead. These substances are widely used by the food and pharmaceutical industries because of their beneficial antimicrobial and antifungal properties.⁸⁸ However, chronic exposure to environmental pollutants has been linked to the development of neurodegenerative diseases, as these substances can accumulate in various organs, such as the brain and gut, with harmful effects. Moreover, due to their antimicrobial activity and accumulation in the gut, these materials can alter the microbiota when ingested, depending on the dose and format of the nanoparticles.²⁸ In two papers presented here,^{28,45} environmental contaminants were found in association with MMD. The contaminant induced the reduction in resident hippocampal microglial cells and stereotyped behavior in the offspring.²⁸ Memory impairment was also reported to be associated with morphological abnormalities in hippocampal dendritic spines,⁴⁵ which could be reversed with a multispecies probiotic containing genus *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Limosilactobacillus*, and *Streptococcus*.⁴⁵ Together, these findings reinforce the role of environmental contaminants in MMD and its consequences to neurodevelopmental and mental health.

Antibiotic administration, in turn, has been pointed out as the most useful method for MMD induction generating a GF-like phenotype. These drugs may influence neurodevelopment by (1) altering the maternal gestational microbiota;⁸⁹ (2) changing the profile of microorganisms passed to the offspring;⁹⁰ (3) changing the absorption of

nutrients by the mother, which may affect the microbiota and milk composition;⁹¹ (4) causing hyperactivation of the HPA axis by altering the maternal microbiota and impairing maternal nurturing behavioral in the postnatal period, which is a stress factor for the offspring.²⁷ Yet, a common criticism regarding the use of antibiotics to deplete the microbiota in animal models is the lack of similarity with what actually occurs in clinics, which use significantly lower doses.³⁸

Furthermore, different combinations and concentrations of antibiotics are used in the literature and, despite generally impacting the most abundant phyla such as Firmicutes and Bacteroidetes, this diversity causes different changes at lower taxonomic levels.⁹² In addition, clinical evidence has already shown that the individual's microbiota before the start of antibiotic treatment is one of the main determining factors for the disturbances that will be caused in the microorganisms populations.⁹³ Together, the combination of antibiotics used and the profile of the healthy microbiota of the animals used in each study might contribute to the heterogeneity observed between the different studies.

In the context of the neuro-immune system, a body of evidence suggests that inflammatory unbalance during pregnancy might facilitate neurodevelopmental psychiatric illness. Elevated levels of gestational maternal pro-inflammatory markers including C reactive protein (CRP) and pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1, and IFN-gamma have been associated with ASD,⁹⁴ SZ,⁹⁵ Parkinson⁹⁶ and Alzheimer disease.^{97–102} Inflammatory environments seem to be related to a brain region-specific microglial activation, such as prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala, with elevated expression of microglial senescence genes (such as Trp⁵³ and I1 β),¹¹ inflammatory mediators (e.g. Cx3cr1),¹¹ and reduced oxytocin signaling,⁴⁰ which are correlated with dysfunctional modeling of synapses and behavior. Finally, evidence from our group and others¹⁰³ has shown a remarkable effect on hippocampal biomarkers of synaptic plasticity when the dysbiosis is provoked during the weaning period (data not published). Therefore, the immune system has been considered a crucial for maintaining hippocampal neurogenesis, social behavior, and cognitive functions.^{104,105}

In particular, for neurodevelopment, the gut maternal enteric microbiota has emerged as a crucial player in the immune system balance and maturation. For instance, in a model of reversible colonization of germ-free mice during gestation, the microbial shapes the neonatal immune system even before birth through molecular signals derived from the microbiota of the mother.³ Otherwise, maternal microbiota was important to mature intestinal innate immune cells and to alter intestinal gene expression profiles in the offspring.^{3,106} A clinical study with a cohort of 1074 newborn infants revealed that maternal gut microbiota might conditionate the composition of child immune cells.¹⁰⁷ Infants clustered by *Dialister*, *Escherichia*, and *Ruminococcus* present lower proportion of granulocytes, and higher proportion of both central naïve CD4 T cells (CD4+/CD45RA+/CD31-) and naïve regulatory T cells (Treg) (CD4+/CD45RA+/FoxP3low). However, the meaning of this last finding for neurodevelopment remains to be elucidated. Therefore, the effect of MMD may have multiple pathways facilitate this bidirectional communication between the maternal gut microbiota and the offspring brain, including direct and humoral interactions of microbes or their metabolites with intrinsic and extrinsic neurons,^{108–110} lymphoid organs-derived soluble inflammatory mediators,¹¹¹ and/or translocation of gut microbial products, such as tryptophan metabolites or SCFAs, into the brain circulation.^{112–114}

Preclinical evidence is further consolidated regarding the neural pathways of enteric dysbiosis on behavior. For example, Sgritta et al.⁴ demonstrated that *L. reuteri* treatment reverses social deficits in a model of autism, including in GF animals, via activation of afferent fibers from the vagus nerve, an important nerve involved in the interaction between the periphery and CNS, for more details see.¹¹⁵ This group observed that *L. reuteri* treatment induces vagal signals to the hypothalamus . paraventricular nuclei (PVN), stimulating oxytocin production via neurons projecting to the VTA, restoring mechanisms of synaptic potentiation in this region.⁴ These findings link the adverse effects of maternal diet- and antibiotic-induced disruption of gut dysbiosis and neurobehavioral impairment of offspring.²⁰

In addition, gut-brain communication also involves the production of hormones, neurotransmitters, and metabolites by enteric microbiota.¹¹⁶ These signaling molecules have local¹¹⁷ and systemic¹¹⁸ effects, and some of them can cross the BBB and act directly on the central nervous system. Regarding the impact of the maternal gestational microbiota on offspring neurodevelopment, preclinical¹⁰³ and clinical⁵³ studies in recent decades have focused primarily on the production of maternal microbial metabolites capable of crossing the placenta and the embryo BBB,¹¹⁹ such as SCFAs. These small organic monocarboxylic acid molecules are the main products of microbial anaerobic fermentation of indigestible polysaccharides, such as dietary fiber, e.g., inulin, and resistant starch in the colon.¹²⁰ Locally, the effects of SCFAs range from maintaining intestinal barrier integrity, mucus production, and protection against inflammation to reducing the risk of colorectal cancer.¹⁰⁶ However, a fraction of these molecules also reach the systemic circulation, and they are capable of crossing both the placenta¹¹⁹ and the BBB,¹¹⁹ which is rich in SCFA transporters.¹⁰⁸ In the brain, SCFAs regulate BBB integrity and function,¹²¹ promote microglial maturation,¹²² reduce neuroinflammation in models of LPS administration¹²³ and ischemic stroke¹²⁴, and affect neuronal function by modulating levels of neurotransmitters and neurotrophic factors.¹⁰⁸ It is therefore speculated that SCFAs play a central role in both microbiota-gut-brain crosstalk¹⁰⁸ and communication between the maternal microbiota and the embryo,¹²⁵ consequently influencing neurodevelopment⁴⁶ and behavior¹²⁶ in the offspring.

Finally, it has been shown that some of the physiological impairments caused by altered gut microbiota may be antagonized, especially if treatment is given in the early stages of neurodevelopment, by (1) oral supplementation with specific probiotics (*L. murinus* HU-1 and *L. reuteri*);^{11,40} (2) co-housing with animals with a healthy microbiota;⁴⁰ (3) treatment with metabolites from the maternal microbiota (e.g., butyrate, trimethylamine N-oxide, and imidazole propionate)^{44,46} and hormones (e.g., oxytocin);⁴⁰ (4) or even targeting inflammatory components in the brain (e.g., Cx3cr1).¹¹ Such manipulations may serve as future therapeutic approaches in an area that needs more research. The available meta-analysis suggests that

maternal gut dysbiosis influences offspring behavior, which in turn is related to individual mental health and susceptibility to psychiatric disorders.

The principal limitation of the studies included in this meta-analysis is the lack of consistency in the standardization of protocols utilized among the different laboratories leading to low reproducibility. Many variables result in conflicting outcomes, including sexual dimorphism, behavioral tests, time and type of maternal dysbiosis utilized, assays to determine the microbiota, species, strain, and age of rodents, dose, and type of antibiotic that the animals were exposed to generate gut dysbiosis. Among these factors, the behavioral differences observed in sexual dimorphism were considered relevant given that, although many studies were performed utilizing male and female rodents,^{11,20,28,38,39,41,42,44} those that investigated males and females individually observed that the male was more sensitive to maternal microbiota-induced behavioral alteration than the females.^{20,39,41,42} Sexual dimorphism has already been reported for the social behavior parading in a study that used female offspring in the social interaction test.¹²⁷ Even in humans, sexual dimorphism may influence the behavior or neurological outcomes linked to enteric microbiota. For instance, a study that evaluated the alpha diversity in six-week-old babies revealed that the higher diversity may be associated with internalizing (anxiety and depression) behavior only in boys, but not among girls, evaluated at age of three years old.¹²⁸ Therefore, despite the high heterogeneity, the present study shows by the current scientific literature the importance of the maternal microbiota in the social behavior of the offspring. Further meta-analyses discriminating behavior outcomes for male and female animals might better clarify the sexual dimorphism associated with MMD.

Therefore, the present work demonstrates the importance of standardizing experimental paradigms in this new area of study so that the large amount of data generated can be analyzed more clearly. It confirms, from the current collection of references, which different environmental disturbances in the maternal enteric microbiota during the gestational period, such as antibiotic administration,^{11,41} diet,⁴⁰ and environmental contaminants,^{20,28,45} can affect the behavior in the offspring during adult life.

Conclusions

Our meta-analysis shows that maternal gut microbiota alterations during pregnancy generate changes in sociability and stereotypic behaviors related to psychiatric disorders in the offspring. The potential long-lasting behavioral disturbances of MMD in memory and mood disorders remain to be better investigated.

Acknowledgments

The authors are thankful to Andreia Vieira, Carla Saudanha, and André Sales for their kind office and technical support. CLO received funds from the Alexander von Humboldt Foundation to keep the website CAMARADES BR (<https://camaradesbrasil.bio.br/>).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [88887.630534/2021-00]; Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro [E-26/203.383/2021].

ORCID

Frederico Rogério Ferreira  <http://orcid.org/0000-0001-5098-9775>

References

- de Groot PF, Frissen MN, de Clercq NC, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future. *Gut Microbes*. 2017;8:253–267. doi:10.1080/19490976.2017.1293224.
- Park JC, Im S-H. Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Exp Mol Med*. 2020;52(9):1383–1396. doi:10.1038/s12276-020-0473-2.
- Gomez de Agüero M, Ganai-Vonarburg SC, Führer T, Rupp S, Uchimura Y, Li H, Steinert A, Heikenwalder M, Hapfelmeier S, Sauer U, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science*. 2016;351(6279):1296–1302. doi:10.1126/science.aad2571.

4. Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, Costa-Mattioli M. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder. *Neuron* [Internet]. 2019;101(2):246–259.e6. doi:10.1016/j.neuron.2018.11.018.
5. Parker A, Romano S, Ansoorge R, Aboelnour A, Le Gall G, Savva GM, Pontifex MG, Telatin A, Baker D, Jones E, et al. Fecal microbiota transfer between young and aged mice reverses hallmarks of the aging gut, eye, and brain. *Microbiome*. 2022;10(1):68. doi:10.1186/s40168-022-01243-w.
6. Jašarević E, Howard CD, Morrison K, Misić A, Weinkopff T, Scott P, Hunter C, Beiting D, Bale TL. The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus. *Nat Neurosci*. 2018;21(8):1061–1071. doi:10.1038/s41593-018-0182-5.
7. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004;558(1):263–275. doi:10.1113/jphysiol.2004.063388.
8. Luo Y, Zeng B, Zeng L, Du X, Li B, Huo R, Liu L, Wang H, Dong M, Pan J, et al. Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):187. doi:10.1038/s41398-018-0240-5.
9. Lee S-H, Yoon S-H, Jung Y, Kim N, Min U, Chun J, Choi I. Emotional well-being and gut microbiome profiles by enterotype. *Sci Rep*. 2020;10(1):20736. doi:10.1038/s41598-020-77673-z.
10. Lee YM, Mu A, Wallace M, Gengatharan JM, Furst AJ, Bode L, Metallo CM, Ayres JS. Microbiota control of maternal behavior regulates early postnatal growth of offspring. *Sci Adv*. 2021;7(5). doi:10.1126/sciadv.abe6563.
11. Lebovitz Y, Kowalski EA, Wang X, Kelly C, Lee M, McDonald V, Ward R, Creasey M, Mills W, Gudenschwager Basso EK, et al. *Lactobacillus* rescues postnatal neurobehavioral and microglial dysfunction in a model of maternal microbiome dysbiosis. *Brain Behav Immun*. 2019;81:617–629. doi:10.1016/j.bbi.2019.07.025.
12. Meyer K, Lulla A, Debroy K, Shikany JM, Yaffe K, Meirelles O, Launer LJ. Association of the gut microbiota with cognitive function in midlife. *JAMA Netw Open*. 2022;5(2):e2143941. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.43941.
13. Safadi JM, Quinton AMG, Lennox BR, Burnet PWJ, Minichino A. Gut dysbiosis in severe mental illness and chronic fatigue: a novel trans-diagnostic construct? A systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2022;27(1):141–153. doi:10.1038/s41380-021-01032-1.
14. Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(1):77–89. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.007.
15. Drell T, Štšepetova J, Simm J, Rull K, Aleksejeva A, Antson A, Tillmann V, Metsis M, Sepp E, Salumets A, et al. The influence of different maternal microbial communities on the development of infant gut and oral microbiota. *Sci Rep*. 2017;7(1):9940. doi:10.1038/s41598-017-09278-y.
16. Dawson SL, O'Hely M, Jacka FN, Ponsonby A-L, Symeonides C, Loughman A, Collier F, Moreno-Betancur M, Sly P, Burgner D, et al. Maternal prenatal gut microbiota composition predicts child behaviour. *EBioMedicine*. 2021;68:103400. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103400.
17. Luck B, Engevik MA, Ganesh BP, Lackey EP, Lin T, Balderas M, Major A, Runge J, Luna RA, Sillitoe RV, et al. Bifidobacteria shape host neural circuits during postnatal development by promoting synapse formation and microglial function. *Sci Rep*. 2020;10(1):7737. doi:10.1038/s41598-020-64173-3.
18. Li N, Yang J, Zhang J, Liang C, Wang Y, Chen B, Zhao C, Wang J, Zhang G, Zhao D, et al. Correlation of gut microbiome between ASD children and mothers and potential biomarkers for risk assessment. *Genom Proteom Bioinform*. 2019;17(1):26–38. doi:10.1016/j.gpb.2019.01.002.
19. Maiuolo J, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C, Scarano F, Nucera S, Scicchitano M, Oppedisano F, Bosco F, Macri R, et al. Involvement of the intestinal microbiota in the appearance of multiple sclerosis: aloe vera and citrus bergamia as potential candidates for intestinal health. *Nutrients*. 2022;14(13):14. doi:10.3390/nu14132711.
20. Bruce-Keller AJ, Fernandez-Kim S-O, Townsend RL, Kruger C, Carmouche R, Newman S, Salbaum JM, Berthoud H-R, Rosenfeld CS. Maternal obese-type gut microbiota differentially impact cognition, anxiety and compulsive behavior in male and female offspring in mice. *Plos One*. 2017;12(4):e0175577. doi:10.1371/journal.pone.0175577.
21. Zheng P, Zeng B, Liu M, Chen J, Pan J, Han Y, Liu Y, Cheng K, Zhou C, Wang H, et al. The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. *Sci Adv*. 2019;5(2):eaau8317. doi:10.1126/sciadv.aau8317.
22. Cryan JF, O'Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V, Dinan TG. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2020;19(2):179–194. doi:10.1016/S1474-4422(19)30356-4.
23. van Beurden YH, de Groot PF, van Nood E, Nieuwdorp M, Keller JJ, Goorhuis A, Beurden YH, Groot PF. Complications, effectiveness, and long term follow-up of fecal microbiota transfer by nasoduodenal tube for treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *United Eur Gastroenterol J*. 2017;5(6):868–879. doi:10.1177/2050640616678099.

24. Karp NA. Reproducible preclinical research—Is embracing variability the answer? *Plos Biol.* 2018;16(3): e2005413. doi:10.1371/journal.pbio.2005413.
25. Eberl G. Addressing the experimental variability associated with the microbiota. *Mucosal Immunol.* 2015;8(3):487–490. doi:10.1038/mi.2015.26.
26. Moore RJ, Stanley D. Experimental design considerations in microbiota/inflammation studies. *Clin Trans Immunol.* 2016;5(7):e92. doi:10.1038/cti.2016.41.
27. Tochitani S, Ikeno T, Ito T, Sakurai A, Yamauchi T, Matsuzaki H, Shankar K. Administration of non-absorbable antibiotics to pregnant mice to perturb the maternal gut microbiota is associated with alterations in offspring behavior. *Plos One.* 2016;11(1): e0138293. doi:10.1371/journal.pone.0138293.
28. Lyu Z, Ghoshdastidar S, Rekha KR, Suresh D, Mao J, Bivens N, Kannan R, Joshi T, Rosenfeld CS, Upendran A. Developmental exposure to silver nanoparticles leads to long term gut dysbiosis and neurobehavioral alterations. *Sci Rep.* 2021;11(1):6558. doi:10.1038/s41598-021-85919-7.
29. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Int J Surg.* 2010;8(5):336–341. doi:10.1016/j.ijsu.2010.02.007.
30. Forero DA, Lopez-Leon S, González-Giraldo Y, Bagos PG, Markel S. Ten Simple rules for carrying out and writing meta-analyses. *Plos Comput Biol.* 2019;15(5):e1006922. doi:10.1371/journal.pcbi.1006922.
31. Yassour M, Jason E, Hogstrom LJ, Arthur TD, Tripathi S, Siljander H, Selvenius J, Oikarinen S, Hyöty H, Virtanen SM, et al. Strain-level analysis of mother-to-child bacterial transmission during the first few months of life. *Cell Host & Microbe.* 2018;24(1):146–154.e4. doi:10.1016/j.chom.2018.06.007.
32. Xue C, Xie Q, Zhang C, Hu Y, Song X, Jia Y, Shi X, Chen Y, Liu Y, Zhao L, et al. Vertical transmission of the gut microbiota influences glucose metabolism in offspring of mice with hyperglycaemia in pregnancy. *Microbiome.* 2022;10(1):122. doi:10.1186/s40168-022-01318-8.
33. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW, de Vries RB. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol [Internet].* 2014;14(1):43. doi:10.1186/1471-2288-14-43.
34. Suurmond R, van Rhee H, Hak T. Introduction, comparison, and validation of Meta-Essentials: a free and simple tool for meta-analysis. *Res Synth Methods.* 2017;8(4):537–553. doi:10.1002/jrsm.1260.
35. Sullivan GM, Feinn R. Using effect size—or why the P value is not enough. *J Grad Med Educ.* 2012;4(3):279–282. doi:10.4300/JGME-D-12-00156.1.
36. Marshall BL, Liu Y, Farrington MJ, Mao J, Helferich WG, Schenk AK, Bivens NJ, Sarma SJ, Lei Z, Sumner LW, et al. Early genistein exposure of California mice and effects on the gut microbiota–brain axis. *J Endocrinol.* 2019;242(2):139–157. doi:10.1530/JOE-19-0214.
37. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry [Internet].* 2013;18(6):666–673. doi:10.1038/mp.2012.77.
38. Leclercq S, Mian FM, Stanisz AM, Bindels LB, Cambier E, Ben-Amram H, Koren O, Forsythe P, Bienenstock J. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun.* 2017;8(1):15062. doi:10.1038/ncomms15062.
39. Afroz KF, Reyes N, Young K, Parikh K, Misra V, Alviña K. Altered gut microbiome and autism like behavior are associated with parental high salt diet in male mice. *Sci Rep.* 2021;11(1):8364. doi:10.1038/s41598-021-87678-x.
40. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell.* 2016;165(7):1762–1775. doi:10.1016/j.cell.2016.06.001.
41. Champagne-Jorgensen K, Mian MF, Kay S, Hanani H, Ziv O, McVey NReufeld K-A, Koren O, Bienenstock J. Prenatal low-dose penicillin results in long-term sex-specific changes to murine behaviour, immune regulation, and gut microbiota. *Brain Behav Immun.* 2020;84:154–163. doi:10.1016/j.bbi.2019.11.020.
42. Hill EM, Howard CD, Bale TL, Jašarević E. Perinatal exposure to tetracycline contributes to lasting developmental effects on offspring. *Anim Microbiome.* 2021;3(1):37. doi:10.1186/s42523-021-00099-z.
43. Sanguinetti E, Guzzardi MA, Tripodi M, Panetta D, Selma-Royo M, Zega A, Telleschi M, Collado MC, Iozzo P. Microbiota signatures relating to reduced memory and exploratory behaviour in the offspring of overweight mothers in a murine model. *Sci Rep.* 2019;9(1):12609. doi:10.1038/s41598-019-48090-8.
44. Vuong HE, Pronovost GN, Williams DW, Coley EJJ, Siegler EL, Qiu A, Kazantsev M, Wilson CJ, Rendon T, Hsiao EY. The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature.* 2020;586(7828):281–286. doi:10.1038/s41586-020-2745-3.
45. Xiao J, Wang T, Xu Y, Gu X, Li D, Niu K, Wang T, Zhao J, Zhou R, Wang H-L. Long-term probiotic intervention mitigates memory dysfunction through a novel H3K27me3-based mechanism in lead-exposed rats. *Transl Psychiatry.* 2020;10(1):25. doi:10.1038/s41398-020-0719-8.
46. Yu L, Zhong X, He Y, Shi Y. Butyrate, but not propionate, reverses maternal diet-induced neurocognitive deficits in offspring. *Pharmacol Res.* 2020;160:105082. doi:10.1016/j.phrs.2020.105082.
47. Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows:

- implications for brain disorders. *Trends Mol Med*. 2014;20(9):509–518. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.002.
48. Monk C, Fernández CR. Neuroscience advances and the developmental origins of health and disease research. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2022;5(4):e229251–e229251. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.9251.
 49. Swanson JM, Entringer S, Buss C, Wadhwa PD. Developmental origins of health and disease: environmental exposures. *Semin Reprod Med*. 2009;27(5):391–402. doi:10.1055/s-0029-1237427.
 50. Peterson D, Bonham KS, Rowland S, Pattanayak CW, Consortium RESONANCE, Klepac-Ceraj V, Deoni SCL, D'Sa V, Bruchhage M, Volpe A, et al. Comparative analysis of 16S rRNA gene and metagenome sequencing in pediatric gut microbiomes. *Front Microbiol* [Internet]. 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.670336.
 51. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for analysis of the microbiome. *Dig Dis Sci*. 2020;65(3):674–685. doi:10.1007/s10620-020-06091-y.
 52. Uzbay T. Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;49:6–10. doi:10.1016/j.coph.2019.03.016.
 53. Urbonaite G, Knyzeliene A, Bunn FS, Smalskys A, Neniskyte U. The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. *Front Neurosci*. 2022;16:909762. doi:10.3389/fnins.2022.909762.
 54. Gupta L, Hoffman KW. Exploring the intersection of the microbiome and the developing brain: impacts on schizophrenia risk. *Schizophr Res*. 2022;247:92–100. doi:10.1016/j.schres.2021.08.010.
 55. Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll A-M, Lolait SJ, Young WS III. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2002;7(9):975–984. doi:10.1038/sj.mp.4001195.
 56. Cunningham AB, Schreibman L. Stereotypy in autism: the importance of function. *Research in Autism Spectrum Disorders* [Internet]. 2008;2(3):469–479. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1750946707000748>
 57. Morrens M, Hulstijn W, Lewi PJ, De Hert M, Sabbe BGC. Stereotypy in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2006;84(2–3):397–404. doi:10.1016/j.schres.2006.01.024.
 58. Ridley RM. The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Progress in Neurobiology* [Internet]. 1994;44(2):221–231. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0301008294900396>
 59. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J Vis Exp*. 2013;82:50978. doi:10.3791/50978.
 60. Robbins TW, Vaghi MM, Banca P. Obsessive-compulsive disorder: puzzles and prospects. *Neuron*. 2019;102:27–47. doi:10.1016/j.neuron.2019.01.046.
 61. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(7):490–502. doi:10.1038/nrn2851.
 62. Li N, Wang Q, Wang Y, Sun A, Lin Y, Jin Y, Li X. Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis. *Stress* [Internet]. 2019;22(5):592–602. doi:10.1080/10253890.2019.1617267.
 63. Schmidt EKA, Torres-Espin A, Raposo PJF, Madsen KL, Kigerl KA, Popovich PG, Fenrich KK, Fouad K, Di Giovanni S. Fecal transplant prevents gut dysbiosis and anxiety-like behaviour after spinal cord injury in rats. *Plos One*. 2020;15(1):e0226128. doi:10.1371/journal.pone.0226128.
 64. Liu T-W, Park Y-M, Holscher HD, Padilla J, Scroggins RJ, Welly R, Britton SL, Koch LG, Vieira-Potter VJ, Swanson KS, et al. Physical activity differentially affects the cecal microbiota of ovariectomized female rats selectively bred for high and low aerobic capacity. *Plos One*. 2015;10(8):e0136150. doi:10.1371/journal.pone.0136150.
 65. Huo R, Zeng B, Zeng L, Cheng K, Li B, Luo Y, Wang H, Zhou C, Fang L, Li W, et al. Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:489. doi:10.3389/fcimb.2017.00489.
 66. Ohl F. Animal models of anxiety. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;169:35–69.
 67. D'Amato A, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Man AI, Le Gall G, Branca JV, Ghelardini C, Amedei A, Bertelli E, Regoli M, et al. Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome* [Internet]. 2020;8(1):140. doi:10.1186/s40168-020-00914-w.
 68. Kim N, Jeon SH, Ju IG, Gee MS, Do J, Oh MS, Lee JK. Transplantation of gut microbiota derived from Alzheimer's disease mouse model impairs memory function and neurogenesis in C57BL/6 mice. *Brain Behav Immun*. 2021;98:357–365. doi:10.1016/j.bbi.2021.09.002.
 69. Burokas A, Arboleya S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biol Psychiatry*. 2017;82(7):472–487. doi:10.1016/j.biopsych.2016.12.031.
 70. Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2006;59(12):1136–1143. doi:10.1016/j.biopsych.2006.03.082.

71. Jašarević E, Rodgers AB, Bale TL. A novel role for maternal stress and microbial transmission in early life programming and neurodevelopment. *Neurobiol Stress*. 2015;1:81–88. doi:10.1016/j.ynstr.2014.10.005.
72. Lima-Ojeda JM, Rupprecht R, Baghai TC. “I am i and my bacterial circumstances”: linking gut microbiome, neurodevelopment, and depression. *Front Psychiatry* [Internet]. 2017;8:153. doi:10.3389/fpsy.2017.00153.
73. Winter G, Hart RA, Charlesworth RPG, Sharpley CF. Gut microbiome and depression: what we know and what we need to know. *Rev Neurosci*. 2018;29(6):629–643. doi:10.1515/revneuro-2017-0072.
74. O'Mahony SM, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Early-life adversity and brain development: is the microbiome a missing piece of the puzzle? *Neuroscience*. 2017;342:37–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.068.
75. Petra AI, Panagiotidou S, Hatzigelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clin Ther*. 2015;37(5):984–995. doi:10.1016/j.clinthera.2015.04.002.
76. Singh S, Sharma P, Pal N, Kumawat M, Shubham S, Sarma DK, Tiwari RR, Kumar M, Nagpal R. Impact of environmental pollutants on gut microbiome and mental health via the gut–brain axis. *Microorganisms*. 2022;10(7):10. doi:10.3390/microorganisms10071457.
77. Vendrik KEW, Ooijevaar RE, de Jong PRC, Laman JD, van Oosten BW, van Hilten JJ, Ducarmon QR, Keller JJ, Kuijper EJ, Contarino MF. Fecal microbiota transplantation in neurological disorders. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:98. doi:10.3389/fcimb.2020.00098.
78. Ramirez J, Guarner F, Bustos Fernandez L, Maruy A, Sdepanian VL, Cohen H. Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:572912. doi:10.3389/fcimb.2020.572912.
79. Besson AA, Lagisz M, Senior AM, Hector KL, Nakagawa S. Effect of maternal diet on offspring coping styles in rodents: a systematic review and meta-analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016;91(4):1065–1080. doi:10.1111/brv.12210.
80. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691–14696. doi:10.1073/pnas.1005963107.
81. Beam A, Clinger E, Hao L. Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota. *Nutrients*. 2021;13(8):2795. doi:10.3390/nu13082795.
82. Berding K, Vlckova K, Marx W, Schellekens H, Stanton C, Clarke G, Jacka F, Dinan TG, Cryan JF. Diet and the microbiota–gut–brain axis: sowing the seeds of good mental health. *Adv Nutr*. 2021;12(4):1239–1285. doi:10.1093/advances/nmaa181.
83. Ellegård L, Andersson H, Bossaers I. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *Eur J Clin Nutr*. 1997;51(1):1–5. doi:10.1038/sj.ejcn.1600320.
84. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol*. 2014;121:91–119. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9.
85. Xie R, Sun Y, Wu J, Huang S, Jin G, Guo Z, Zhang Y, Liu T, Liu X, Cao X, et al. Maternal high fat diet alters gut microbiota of offspring and exacerbates DSS-induced colitis in adulthood. *Front Immunol*. 2018;9:2608. doi:10.3389/fimmu.2018.02608.
86. Bellisario V, Panetta P, Balsevich G, Baumann V, Noble J, Raggi C, Nathan O, Berry A, Seckl J, Schmidt M, et al. Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;60:138–150. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.012.
87. Winther G, Elfving B, Müller HK, Lund S, Wegener G. Maternal high-fat diet programs offspring emotional behavior in adulthood. *Neuroscience*. 2018;388:87–101. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.07.014.
88. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1534. doi:10.3390/ijms17091534.
89. Chen C-M, Chou H-C, Y-CSH Y. Maternal antibiotic treatment disrupts the intestinal microbiota and intestinal development in neonatal mice [Internet]. *Front Microbiol*. 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.684233.
90. Dierikx TH, Visser DH, Benninga MA, van Kaam AHL, de Boer NKH, de Vries R, van Limbergen J, de Meij TGJ, van Kaam AHL, de Boer NKH, et al. The influence of prenatal and intra-partum antibiotics on intestinal microbiota colonisation in infants: a systematic review. *J Infect* [Internet]. 2020;81(2):190–204. doi:10.1016/j.jinf.2020.05.002.
91. Demmelmair H, Jiménez E, Collado MC, Salminen S, McGuire MK. Maternal and perinatal factors associated with the human milk microbiome. *Curr Dev Nutr*. 2020;4(4):nzaa027. doi:10.1093/cdn/nzaa027.
92. Yang L, Bajinka O, Jarju PO, Tan Y, Taal AM, Ozdemir G. The varying effects of antibiotics on gut microbiota. *AMB Express*. 2021;11(1):116. doi:10.1186/s13568-021-01274-w.
93. Rashidi A, Ebadi M, Rehman TU, Elhusseini H, Nalluri H, Kaiser T, Holtan SG, Khoruts A, Weisdorf DJ, Staley C. Gut microbiota response to antibiotics is personalized and depends on baseline microbiota. *Microbiome* [Internet]. 2021;9(1):211. doi:10.1186/s40168-021-01170-2.
94. Chudal R, Brown AS, Gyllenberg D, Hinkka-Yli-Salomäki S, Sucksdorff M, Surcel H-M, Upadhyaya S, Sourander A. Maternal serum C-reactive protein (CRP) and offspring attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2020;29(2):239–247. doi:10.1007/s00787-019-01372-y.

95. Brown AS, Meyer U. Maternal immune activation and neuropsychiatric illness: a translational research perspective. *Am J Psychiatry*. 2018;175(11):1073–1083. doi:10.1176/appi.ajp.2018.17121311.
96. Carvey PM, Chang Q, Lipton JW, Ling Z. Prenatal exposure to the bacteriotxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential, new model of Parkinson's disease. *Front Biosci*. 2003;8(6):s826–37. doi:10.2741/1158.
97. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*. 2016;12(6):719–732. doi:10.1016/j.jalz.2016.02.010.
98. Kim E, Paik D, Ramirez RN, Biggs DG, Park Y, Kwon H-K, Choi GB, Huh JR. Maternal gut bacteria drive intestinal inflammation in offspring with neurodevelopmental disorders by altering the chromatin landscape of CD4+ T cells. *Immunity*. 2022;55(1):145–158.e7. doi:10.1016/j.immuni.2021.11.005.
99. Spini VBMG, Ferreira FR, Gomes AO, Duarte RMF, Oliveira VHS, Costa NB, Ferreira AFF, Dourado MDPB, Ribeiro-Barbosa ER. Maternal immune activation with H1N1 or toxoplasma gondii antigens induces behavioral impairments associated with mood disorders in rodents. *Neuropsychobiology*. 2020;320. doi:10.1159/000510791.
100. Ferreira FR, de Moura NSB, Hassib L, Pombo TR, de Moura NSB. Resveratrol ameliorates the effect of maternal immune activation associated with schizophrenia in adulthood offspring. *Neurosci Lett* [Internet]. 2020;734:135100. doi:10.1016/j.neulet.2020.135100.
101. Ferreira FR, de Paula GC, de Carvalho RJ V, Ribeiro-Barbosa ER, Spini VBMG, de Paula G, de Carvalho RV. Impact of season of birth on psychiatric disorder susceptibility and drug abuse incidence in a Population from the Köppen Tropical Savanna Region of Brazil. *Neuropsychobiology*. 2020;79(2):131–140. doi:10.1159/000503069.
102. Xu Z, Zhang X, Chang H, Kong Y, Ni Y, Liu R, Zhang X, Hu Y, Yang Z, Hou M, et al. Rescue of maternal immune activation-induced behavioral abnormalities in adult mouse offspring by pathogen-activated maternal T(reg) cells. *Nat Neurosci*. 2021;24(6):818–830. doi:10.1038/s41593-021-00837-1.
103. Di Gesù CM, Matz LM, Bolding II, Fultz R, Hoffman KL, Gammazza AM, Petrosino JF, Buffington SA. Maternal gut microbiota mediate intergenerational effects of high-fat diet on descendant social behavior. *Cell Rep*. 2022;41:111461. doi:10.1016/j.celrep.2022.111461.
104. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. 2006;9(2):268–275. doi:10.1038/nn1629.
105. Filiano AJ, Xu Y, Tustison NJ, Marsh RL, Baker W, Smirnov I, Overall CC, Gadani SP, Turner SD, Weng Z, et al. Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature*. 2016;535(7612):425–429. doi:10.1038/nature18626.
106. Ganai-Vonarburg SC, Fuhrer T, Gomez de Agüero M. Maternal microbiota and antibodies as advocates of neonatal health. *Gut Microbes*. 2017;8(5):479–485. doi:10.1080/19490976.2017.1299847.
107. Gao Y, O'Hely M, Quinn TP, Ponsonby A-L, Harrison LC, Frøkiær H, Tang MLK, Brix S, Kristiansen K, Burgner D, et al. Maternal gut microbiota during pregnancy and the composition of immune cells in infancy. *Front Immunol*. 2022;13:986340. doi:10.3389/fimmu.2022.986340.
108. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.
109. Zheng W, Zhao W, Wu M, Song X, Caro F, Sun X, Gazzaniga F, Stefanetti G, Oh S, Mekalanos JJ, et al. Microbiota-targeted maternal antibodies protect neonates from enteric infection. *Nature* [Internet]. 2020;577(7791):543–548. doi:10.1038/s41586-019-1898-4.
110. Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnic K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2007;27(40):10695–10702. doi:10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007.
111. Jacobson A, Yang D, Vella M, Chiu IM. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol*. 2021;14(3):555–565. doi:10.1038/s41385-020-00368-1.
112. Morris G, Berk M, Carvalho A, Caso JR, Sanz Y, Walder K, Maes M. The role of the microbial metabolites including tryptophan catabolites and short chain fatty acids in the pathophysiology of immune-inflammatory and neuroimmune disease. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4432–4451. doi:10.1007/s12035-016-0004-2.
113. Bosi A, Banfi D, Bistoletti M, Giaroni C, Baj A. Tryptophan metabolites along the microbiota-gut-brain axis: an interkingdom communication system influencing the gut in health and disease. *Int J Tryptophan Res*. 2020;13:1178646920928984. doi:10.1177/1178646920928984.
114. Hoffiz YC, Castillo-Ruiz A, Hall MAL, Hite TA, Gray JM, Cisternas CD, Cortes LR, Jacobs AJ, Forger NG. Birth elicits a conserved neuroendocrine response with implications for perinatal osmoregulation and neuronal cell death. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):2335. doi:10.1038/s41598-021-81511-1.
115. Maier SF, Goehler LE, Fleshner M, Watkins LR. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840(1):289–300. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09569.x.

116. Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The brain-gut-microbiome axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6(2):133–148. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.04.003.
117. Lai Y, Dhingra R, Zhang Z, Ball LM, Zylka MJ, Lu K. Toward elucidating the human gut microbiota–brain axis: molecules, biochemistry, and implications for health and diseases. *Biochem Implications Health Diseases Biochem*. 2021;61(24):2806–2821. doi:10.1021/acs.biochem.1c00656.
118. Baj A, Moro E, Bistoletti M, Orlandi V, Crema F, Giaroni C. Glutamatergic signaling along the microbiota-gut-brain Axis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):20. doi:10.3390/ijms20061482.
119. Ziętek M, Celewicz Z, Szczuko M. Short-chain fatty acids, maternal microbiota and metabolism in pregnancy. *Nutrients*. 2021;13(4):1244. doi:10.3390/nu13041244.
120. Miller TL, Wolin MJ. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1996;62(5):1589–1592. doi:10.1128/aem.62.5.1589-1592.1996.
121. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Kundu P, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6(263):263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759.
122. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mhlahkoiv T, Jakobshagen K, Buch T, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* [Internet]. 2015;18(7):965–977. doi:10.1038/nn.4030.
123. Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, Shirawachi S, Asano S, Aizawa H, Yamawaki S, et al. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res* [Internet]. 2018;1680:13–38. <https://www.science-direct.com/science/article/pii/S0006899317305383>
124. Patnala R, Arumugam TV, Gupta N, Dheen ST. HDAC inhibitor sodium butyrate-mediated epigenetic regulation enhances neuroprotective function of microglia during ischemic stroke. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017;54(8):6391–6411. doi:10.1007/s12035-016-0149-z.
125. Needell JC, Ir D, Robertson CE, Kroehl ME, Frank DN, Zipris D, Mounier C. Maternal treatment with short-chain fatty acids modulates the intestinal microbiota and immunity and ameliorates type 1 diabetes in the offspring. *Plos One*. 2017;12(9):e0183786. doi:10.1371/journal.pone.0183786.
126. Liu Z, Li L, Ma S, Ye J, Zhang H, Li Y, Sair AT, Pan J, Liu X, Li X, et al. High-dietary fiber intake alleviates antenatal obesity-induced postpartum depression: roles of gut microbiota and microbial metabolite short-chain fatty acid involved. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2020;68(47):13697–13710. doi:10.1021/acs.jafc.0c04290.
127. Kopachev N, Netser S, Wagner S. Sex-dependent features of social behavior differ between distinct laboratory mouse strains and their mixed offspring. *iScience*. 2022;25:103735. doi:10.1016/j.isci.2022.103735.
128. Laue HE, Karagas MR, Coker MO, Bellinger DC, Baker ER, Korrick SA, Madan JC. Sex-specific relationships of the infant microbiome and early-childhood behavioral outcomes. *Pediatr Res*. 2021;92(2):580–591. doi:10.1038/s41390-021-01785-z.