

DANIEL MAY DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO GRAXO DE CADEIA CURTA,
ACETATO, NAS CÉLULAS DA MICROGLIA ATIVADAS POR
LIPOPOLISSACÁRIDE (LPS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Co-orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de teses e dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

RESUMO

Oliveira DM. Efeito do ácido graxo de cadeia curta, acetato, nas células da microglia ativadas por lipopolissacáride (LPS) [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são compostos que contêm de 1 a 6 átomos de carbono, sendo butirato e propionato os mais estudados. Estudos mostraram que possuem efeitos imunomoduladores, antiproliferativos e pró-apoptóticos, via ativação de receptores acoplados à proteína G (GPR 41 e 43) ou via controle epigenético, agindo na histona acetil transferase (HAT) e na histona deacetilase (HDAC). O acetato é o AGCC encontrado em maiores concentrações nos cólons e no sangue, sendo também um intermediário em diversas reações metabólicas. Apesar disso, foi pouco estudado até o momento. As células da microglia são os macrófagos residentes no sistema nervoso central e desempenham importante papel em diversas doenças. **Hipótese:** Apesar dos seus efeitos pró-apoptóticos, o acetato induz citoproteção secundária aos seus efeitos imunomoduladores. **Objetivo:** estudar os efeitos do acetato na microglia esclarecendo seus efeitos na produção de mediadores inflamatórios e na viabilidade celular. **Método:** Foram utilizadas culturas primárias de microglia de camundongo e culturas de linhagem imortalizada de microglia (C8-B4). A microglia foi ativada com lipopolissacáride (LPS). A toxina pertussis (PTX) e a tricostatina A, um inibidor de HDAC, foram usados, respectivamente, para bloquear os receptores GPR e mimetizar efeitos epigenéticos. Os parâmetros avaliados foram a produção de mediadores inflamatórios e a viabilidade celular. **Resultados:** O tratamento com acetato (25 mM) mostrou efeitos citoprotetores em culturas de microglia estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. O tratamento alterou ainda a produção de citocinas pela linhagem de microglia com redução da produção de IL-6 e aumento da produção de TNF- α . O tratamento de culturas primárias com diferentes doses de acetato mostrou resultados semelhantes, confirmando o aumento da produção de TNF- α . O bloqueio da ação de receptores GPR pela PTX não reverteu os efeitos do acetato. A tricostatina mimetizou os efeitos do acetato, induzindo tanto citoproteção quanto aumento de TNF- α . O uso simultâneo de acetato e tricostatina não mostrou somatória de efeitos. O acetato não alterou a atividade de HDAC, mas houve aumento da atividade de HAT nas culturas tratadas com LPS. A expressão da proteína p62 foi avaliada com 12, 24 e 48 horas de tratamento. O acetato reduziu a expressão nos três tempos. A quantificação dos lisossomos após 24 horas de tratamento mostrou aumento do número de lisossomos nos grupos tratados com acetato em relação aos demais ($p < 0,001$). O bloqueio da autofagia com cloroquina reverteu os efeitos citoprotetores do acetato após 48 horas de tratamento. **Conclusão:** O acetato estimula a produção de TNF- α e melhora a viabilidade de culturas da microglia ativadas por LPS. A melhora da viabilidade celular ocorre pela indução de autofagia. O mecanismo responsável pela indução da autofagia é epigenético, sendo completamente independente da ativação de receptores GPR.

Palavras-chave: Acetato. Ácido graxo de cadeia curta. Microglia. Lipopolissacáride. Inflamação. Viabilidade celular. Autofagia.

ABSTRACT

Oliveira DM. Effect of the short chain fatty acid, acetate, on microglial cells activated by lipopolysaccharide (LPS) [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Introduction: short-chain fatty acids (SCFA) are compounds containing from 1 to 6 carbon atoms, propionate and butyrate being the most studied. Studies have shown that these compounds have immunomodulatory, anti-proliferative and pro-apoptotic effects via activation of G-protein coupled receptors (GPR 41 and 43) or via epigenetic control acting on histone acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC). Acetate is the SCFA found in highest concentrations in the colon and blood. It is also an intermediate in many metabolic reactions. Nevertheless, it was little studied so far. The microglial cells are resident macrophages of the central nervous system and play an important role in several diseases. **Hypothesis:** Despite its pro-apoptotic effects, acetate induces cytoprotection which is secondary to immunomodulatory effects. **Objective:** To study the effects of acetate on microglia and clarify its effects on inflammatory mediators' production and cell viability. **Method:** Primary mouse microglial cultures and immortalized lineage (C8-B4) were used. The microglia was activated with lipopolysaccharide (LPS). Pertussis toxin (PTX) and trichostatin A, an inhibitor of HDAC, were used, respectively, to block GPR receptors and mimic epigenetic effects. We evaluated the production of inflammatory mediators and cell viability. **Results:** Treatment with acetate (25 mM) showed cytoprotective effects in microglial cultures stimulated with LPS 0.25 μ g/ml. The treatment also altered production of cytokines by the microglial strain with decreased IL-6 production and increased TNF- α production. The treatment of primary cultures with different doses of acetate showed similar results confirming increased TNF- α production. The blockade of GRP receptors with PTX did not reverse the effects of acetate. Trichostatin mimicked the effects of the acetate inducing cytoprotection and increasing TNF- α production. Simultaneous use of acetate and trichostatin showed no sum of effects. Acetate did not affect HDAC activity, but there was an increase in HAT activity in cultures treated with LPS. Expression of p62 protein was analyzed 12, 24 and 48 hours of treatment. Acetate reduced its expression at all times tested. The quantification of lysosomes after 24 hours of treatment showed increased number of lysosomes in groups treated with acetate compared to the others (p <0.001). The blocking of autophagy with chloroquine reversed cytoprotective effects acetate after 48 hours of treatment. **Conclusion:** Acetate stimulates TNF- α production and improves cell viability of microglial cultures activated by LPS. The improved cell viability occurs by autophagy induction. The mechanism responsible for induction of autophagy is epigenetic, being completely independent of the GRP receptor activation.

Keywords: Acetate. Short Chain Fatty Acid. Microglia. Lipopolysaccharide. Inflammation.

Cell viability. Autophagy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

Fermentação é definida como conjunto de reações metabólicas de caráter anaeróbico que tem como resultado final a produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). Ela se diferencia da cadeia respiratória por usar um composto orgânico como acceptor final de hidrogênios. Na cadeia respiratória, que caracteriza a respiração celular, o oxigênio desempenha esse papel. A relevância do processo de fermentação reside no fato de ser uma fonte de energia em situações onde a produção de ATP não pode ser mantida pelo processo de fosforilação oxidativa (1).

Bactérias anaeróbicas são sensíveis à presença de oxigênio, sendo restritas, portanto, a ambientes com mínima concentração de oxigênio. Existem, no entanto, bactérias anaeróbicas facultativas capazes de usar a fermentação em condições anaeróbicas e a respiração em condições aeróbicas. Existem ainda micro-organismos que realizam fermentação mesmo na presença de grandes concentrações de oxigênio como as leveduras (1).

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são compostos orgânicos que possuem de 1 a 5 átomos de carbono, por exemplo: formato (C1), acetato (C2), proprionato (C3), butirato (C4) e valerato (C5)(2). São produzidos em grandes

quantidades nos intestinos como resultado da fermentação de compostos alimentares pela microbiota (3-6). Entre os principais alimentos responsáveis por sua produção destacam-se as fibras alimentares e os carboidratos complexos não digeríveis presentes nos chamados amidos resistentes (do inglês: *resistant starches*) que são compostos resistentes à ação de enzimas digestivas e à absorção no intestino delgado (7, 8). Além desses, formas modificadas de celulose, alguns açúcares não absorvíveis e proteínas também representam compostos que sofrem fermentação nos cólons e contribuem em menor parte para produção de AGCC nos cólons (2, 9).

Além da presença de substrato adequado, outros fatores também influenciam na produção e absorção de AGCC como tempo de trânsito intestinal (10-12), quantidade e tipo da microbiota (10). Alguns autores destacam filos bacterianos responsáveis pela fermentação de fibras, outros preferem classificar as bactérias produtoras de AGCC como um grupo funcionalmente distinto evitando diferenciação filogenética (13). Nesse contexto, algumas espécies bacterianas como *bifidobacterium* e *lactobacillus* foram associadas com melhor saúde o que levou à ideia do uso de probióticos como forma de prevenir ou tratar doenças. O mecanismo subjacente à ação dessas substâncias pode ser a produção de AGCC (10).

Acetato, proprionato e butirato são os AGCC mais estudados. Destes o butirato é o mais estudado por seus potentes efeitos anti-inflamatórios (14). Todavia, o acetato é produzido em maior quantidade numa relação de concentrações molares da ordem de 60:20:20 respectivamente (4, 6). Por ser

rapidamente transportado ao fígado, é menos utilizado pelas células colônicas (11) o que contribui para que seja encontrado em maiores concentrações séricas (6).

A relevância clínica da presença de fibras na dieta foi demonstrada em estudo piloto onde pacientes com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) receberam 60 g de aveia por dia por três meses. Em comparação ao grupo controle, esses pacientes apresentaram menos dor abdominal e melhor evolução clínica (15). Alguns estudos mostraram melhora de parâmetros histológicos com uso de enemas com butirato (16, 17), no entanto nem sempre o resultado foi melhor que o do controle (18). Em comum, esses estudos tiveram tempo de acompanhamento de não mais que 12 semanas, não permitindo, portanto, conclusões sobre o efeito de longo prazo dos AGCC nesse tipo de doença.

1.2 RECEPTORES DE AGCC ACOPLADOS À PROTEÍNA G

Em 2003, os receptores acoplados a proteína G (GPR) 41 e 43 foram identificados como receptores dos AGCC. O GPR41 é expresso por uma ampla gama de tecidos, sendo o tecido adiposo o de maior expressão seguido por baço, pâncreas e placenta. Enquanto ossos, cartilagens e macrófagos apresentam as mais baixas taxas de expressão. Em geral, esse receptor apresenta baixa expressão tecidual. O GPR43 tem alta expressão gênica em amostras de baço, adenoides, miométrio e mamas. Quando avaliada em células purificadas, neutrófilos e monócitos apresentam expressão elevada, seguidos por mononucleares de sangue periférico e linfócitos B (19). Logo, o GPR43 parece estar mais associado ao

sistema imune enquanto o GPR41 parece estar mais associado ao metabolismo. Ambos funcionam a partir da ativação da proteína G inibitória (20).

Em relação à potência de ativação, para o GPR41 o propionato é o composto de maior atividade agonista seguido por butirato e depois, acetato, sendo esse último 100 vezes menos potente que o propionato. Para o GPR43 também o propionato tem a maior atividade agonista seguido por acetato e butirato que possuem potência semelhante (20).

A relevância do GPR43 na resposta imune foi evidenciada por diversos estudos. Animais GPR43^{-/-} apresentam resposta imune exacerbada em modelos de artrite, colite e asma com maior produção de mediadores inflamatórios por células do sistema imune. Efeito semelhante é observado em animais livres de bactérias (“germ-free”) e é revertido pela reposição de acetato (21).

É interessante ressaltar que embora o GPR43 tenha sido relacionado ao sistema imune, também pode ter efeitos sobre o metabolismo. Foi demonstrado que a ativação deste receptor em adipócitos induz inibição da lipólise e redução dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (22). Outro elo entre GPR43 e metabolismo foi sugerido por estudo que demonstrou que a ativação desse receptor em adipócitos estimula a produção de leptina (23).

A maior expressão do GPR41 em tecido adiposo sinaliza que esse receptor é mais relevante para o metabolismo que para o sistema imune. De fato, um estudo mostrou que diferentes AGCC são capazes de estimular a produção de leptina por adipócitos. É interessante ressaltar que as concentrações utilizadas nesse estudo estavam dentro dos padrões fisiológicos o que aumenta a importância do achado (24).

A leptina é hormônio responsável pela sensação de saciedade (25). Pode-se imaginar, portanto, uma relação entre AGCC e obesidade. Essa suposição é corroborada pelo fato de que camundongos machos GPR41^{-/-} apresentam aumento da gordura corporal (26). Embora esses achados façam crer que o GPR41 está ligado ao metabolismo, não se deve perder de vista que a leptina e o tecido adiposo possuem estreitas relações com o sistema imune (27-31), logo não se pode descartar que esse receptor tenha papel relevante na resposta imune.

Recentemente, foi identificado um terceiro receptor responsivo aos AGCC. O receptor olfatório 78 (Olf78) é expresso nos rins, nos ramos principais da artéria renal e nas células da junção justaglomerular responsáveis pela secreção de renina. Ao contrário dos outros receptores dos AGCC, o receptor Olf78 mostrou-se responsivo apenas ao acetato e ao propionato respondendo a ativação com liberação de renina e efeito pró-hipertensivo. No entanto o estudo mostrou que prevalece o efeito hipotensivo dos AGCC no rim que é mediado pelo receptor GPR41 (32). Tanto a expressão quanto as possíveis funções do receptor Olf78 em outros tecidos foram pouco estudadas até o momento, porém já foi demonstrada sua expressão em nervos autonômicos e músculo liso (33, 34). Não se sabe ao certo qual tipo de proteína G é ativada pelo Olf78, porém, tendo em vista que sua ativação renal se contrapõe aos efeitos da ativação do GPR41, especula-se que ative a proteína Gs (32).

A descoberta da ativação do Olf78 por AGCC mostra que a importância desses compostos na fisiologia humana é ainda campo aberto a inúmeras descobertas, pois, possivelmente, esse receptor deve ser expresso em vários outros tecidos onde deve desempenhar funções outras não necessariamente relacionadas

ao controle pressórico. Além disso, é provável que outros receptores para os AGCC ainda venham a ser identificados.

1.3 AGCC E CONTROLE EPIGENÉTICO

Epigenética pode ser definida como “o conjunto de adaptações estruturais de regiões cromossômicas que permite registrar, sinalizar ou perpetuar estados alterados de atividade”(35). As “adaptações estruturais” podem ocorrer por modificações no próprio DNA, por exemplo: metilação de DNA e RNAs de interferência, alterações pós-translacionais nas histonas ou substituição de histonas por variantes especializadas e ainda por remodelamento de histonas dependente de ATP que altera as relações de contato entre histonas e DNA (36). O resultado final dessas alterações determina a intensidade da compactação da cromatina definido como aberto (eucromatina) ou fechado (heterocromatina) (37).

Entre as várias alterações epigenéticas em histonas destaca-se a acetilação. Nesse processo a adição de grupos acetil negativamente carregados a resíduos de lisina na porção N-terminal das histonas ajuda a neutralizar a carga positiva desses aminoácidos reduzindo a atração eletrostática DNA-histona e facilitando o acesso dos fatores de transcrição. Logo, quanto maior a acetilação, maior a capacidade de aumento da transcrição gênica em um segmento de DNA (38).

Dois tipos de enzimas respondem pelo grau de acetilação de DNA, as acetiltransferases de histonas (HAT, do inglês: *histone acetyl transferases*) que catalisam a transferência de grupos acetil aos resíduos de lisina, e as histona

deacetilases (HDAC) que catalisam a remoção desses grupos (39). Nos mamíferos existem 4 grupos de HDACs: classes I, II e IV (zinco dependentes) e classe III, ATP dependentes e também conhecidas como sirtuínas (40). As HDAC das classes I, II e IV são ainda subdivididas em: Classe I, HDAC 1, 2,3 e 8; classe II, HDAC 4, 5, 6, 7 e 9 e classe IV, HDAC 11 (41). As HAT também são divididas em diferentes famílias e se distribuem tanto no núcleo quanto no citoplasma. Suas principais famílias são: p300/CBP, MYST, GNAT e NCOA (42). Essas famílias são subdivididas em vários membros, por exemplo: GCN5 e PCAF são dois membros da família GNAT encontrados em humanos, Tip60 é um dos vários membros da família MYST encontrados em humanos (42, 43).

Foi demonstrado que os AGCC têm a capacidade de inibir a atividade das HDACs. Desde 1979, sabe-se que o butirato é inibidor não competitivo da HDAC de classe I (44). Em relação ao acetato, um estudo mostrou que o tratamento com dose única não alterou o padrão de acetilação em amostras de fígado, porém foi eficiente em inibir a atividade de HDAC em amostras de cérebro extraídas entre 2 e 4 horas após o tratamento. Foi detectada ainda redução da expressão da HDAC 2 que ocorreu 4 horas após o tratamento. Os autores avaliaram a expressão de outras HDACs (1, 2, 3, 4, 5 e 7), nenhuma dessas mostrou alteração na expressão (45). Outro estudo avaliou o efeito do tratamento crônico em modelo de neuroinflamação induzida por LPS. O acetato foi administrado durante os 28 dias anteriores aos experimentos. Houve aumento da acetilação de histonas com aumento da atividade de HATs. O efeito em HDACs foi variável com redução ou aumento da expressão dependendo da enzima avaliada. Ocorreu ainda redução da expressão de IL-1 β sugerindo que o tratamento resultou em redução da

neuroinflamação (46). Estudo que avaliou o efeito do acetato em modelo de neuroborreliose em ratos encontrou efeitos semelhantes com redução da ativação de microglia e da expressão cerebral de IL-1 β (47). O acetato foi também testado em culturas de microglia estimuladas com LPS (6,25 ng/ml por 4 horas). O tratamento reverteu a hipoacetilação de histona (H3K9) induzida pelo LPS e reduziu a expressão proteica de IL-6, IL-1 β e TNF- α (48). Resultados semelhantes foram encontrados quando o mesmo esquema de tratamento com LPS e a mesma dose de acetato (12 mM) foram usados em astrócitos (49).

O conjunto de dados da literatura disponível até o momento sugere que o acetato acentua a acetilação de DNA no SNC através de diferentes mecanismos que variam de acordo com a dose e o tempo de tratamento. O resultado dessa maior acetilação se manifesta na forma de atenuação de parâmetros inflamatórios como expressão de citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata. Pode-se especular que o efeito final dessa cadeia de eventos *in vivo* seja a preservação de neurônios e uma melhor evolução clínica em situações de neuroinflamação.

1.4 INFLUÊNCIA DOS AGCC NO SISTEMA IMUNE

Os efeitos dos AGCC no sistema imune foram evidenciados em diversos estudos. O butirato inibe a produção de IL-12 e acentua a expressão de IL-10 em monócitos humanos derivados de mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimulados com estafilococos aureus. O mesmo estudo mostrou ainda redução da

expressão de IL-12R em PBMC estimuladas com anti-CD3 com consequente redução da produção de INF- γ e inibição da resposta Th1 (50). Em outro estudo, o tratamento com butirato levou à redução da translocação do NF-kB para o núcleo e redução da expressão de IL-6, IL-1 β e TNF- α (14). Na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 butirato e acetato inibem a expressão de iNOS, TNF- α e IL-6 induzidas por INF- γ e aumentam a expressão de IL-10 (51).

Nem todos os estudos mostram efeitos anti-inflamatórios relacionados aos AGCC. Linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de rato estimulados com concavalina A reduzem a produção de INF- γ quando estimulados com butirato e aumentam quando tratados com acetato ou propionato. Por outro lado, acetato e propionato aumentam a produção de IL-10 que não é influenciada pelo butirato, os três compostos combinados levaram ao desenvolvimento de linfócitos com perfil menos inflamatório (52).

O efeito dos AGCC na quimiotaxia pode variar consideravelmente de acordo com o tipo de estímulo quimiotático, dose, ou tipo celular empregado, por exemplo: um estudo utilizou duas linhagens diferentes de células humanas intestinais estimuladas com IL-1 β , Caco-2 e HT-29. A mesma dose de butirato (5 mM) reduziu a migração de neutrófilos em relação à linhagem Caco-2 e aumentou em relação à HT-29. O resultado contraditório foi explicado pela produção de IL-8, reduzida na linhagem Caco-2 e aumentada na HT-29 (53).

Em relação ao estímulo quimiotático, um estudo avaliou a migração de neutrófilos induzida por ensaio de bolsa de ar em tecido subcutâneo. O tratamento

com AGCC foi efetivo em aumentar a migração de neutrófilos. Dos AGCC testados, o acetato mostrou o efeito menos proeminente. Quando o peptídeo bacteriano formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) foi utilizado, nenhuma diferença foi observada (54) mostrando que o efeito dos AGCC na quimiotaxia de neutrófilos é dependente do estímulo empregado.

Em células mononucleares os resultados são menos contraditórios. O butirato inibe a migração de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e macrófagos primários de ratos estimulados com LPS (55). Acetato, butirato e propionato inibem a produção, tanto constitutiva quanto estimulada por LPS, de MCP-1 em monócitos humanos (56).

Em princípio, o efeito quimiotático dos AGCC é mediado pela ativação do receptor GPR43. Em modelo de colite crônica induzida por dextran, animais GPR43^{-/-} mostraram redução da quimioatração de polimorfonucleares e redução da lesão tecidual inflamatória, porém não houve diferenças quando o modelo empregado era completamente estéril mostrando a importância da microbiota para ativação do receptor. O estudo também mostrou redução da adesão e da expressão de L-selectina após tratamento com propionato e butirato (57).

Em cultura primária de microglia de rato, o butirato reduziu a produção de IL-6 e TNF- α e óxido nítrico (NO) quando foi administrado 22 horas antes do estímulo com LPS, mas reduziu apenas a produção de IL-6 e elevou a liberação de NO quando foi administrado simultaneamente ao LPS (58). Em outro estudo, o butirato foi efetivo em reduzir a produção de NO e a expressão de iNOS induzida

por INF- γ , mas não por LPS (59). As diferenças entre os regimes de tratamento impedem uma comparação direta entre esses dois estudos.

Em células de adenocarcinoma humano da linhagem HT-29, células humanas de lâmina própria, PBMC e em ratos com colite induzida por trinitrobenzeno, o efeito anti-inflamatório do butirato ocorre pela inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (60) provavelmente em decorrência da inibição da HDAC (61). A atividade do NF- κ B está alterada em doenças inflamatórias intestinais como, por exemplo: Doença de Crohn e RCUI (62, 63), porém a importância desse achado vai além da inflamação propriamente dita uma vez que a atividade dessa molécula também está frequentemente alterada no câncer de cólon (64).

Os AGCC também apresentam efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos. O butirato inibe a proliferação celular com efeitos que diferem de acordo com o tipo de célula testada. O efeito pró-apoptótico por sua vez parece estar associado ao efeito antiproliferativo. Também parece haver associação entre o grau de diferenciação e a eficácia do butirato, células de adenocarcinoma colônico HT-29 tratadas com butirato reduzem sua taxa de proliferação e aumentam sua taxa de apoptose e o seu grau de diferenciação enquanto células normais de epitélio de cólon não são afetadas (65).

O butirato induz apoptose em células de câncer colorretal HCT116 via ativação de p38, indução de estresse de retículo e ativação de caspases 3 e 7 (66). Efeito semelhante foi demonstrado em células de adenocarcinoma colorretal HT-29.

É interessante comentar que a exposição prolongada dessas células a doses gradualmente aumentadas de butirato produziu células resistentes ao efeito pró-apoptótico. Comparação entre células com e sem exposição prolongada ao butirato revelou que a resistência ao efeito pró-apoptótico ocorreu após aumento da capacidade de expressão de proteínas antiapoptóticas e ligadas ao ciclo celular (67). O butirato também apresenta efeitos antiproliferativos em diferentes células do sistema imune como: linfócitos T, macrófagos derivados de medula óssea, e células RAW 264.7. O efeito pró-apoptótico, no entanto, foi observado apenas em linfócitos T ativados e na linhagem imortalizada de macrófagos (68). O mesmo estudo sugeriu que as ações pró-apoptóticas e imunomodulatórias do butirato são mais proeminentes em células que estão ativamente proliferando e menos expressivos em células mais diferenciadas e em repouso (68).

O acetato também foi associado a efeito pró-apoptótico. Em estudo com animais GPR43^{-/-} a dose de 10 mM induziu apoptose de forma GPR43 dependente em neutrófilos, porém a dose de 30 mM foi efetiva em induzir apoptose de neutrófilos mesmo em animais deficientes de GPR43 embora o resultado fosse menos proeminente. Isso sugere que o acetato é capaz de induzir apoptose de neutrófilos através de diferentes mecanismos dependendo da dose utilizada (21). Em neutrófilos humanos, a dose de 4 mM de acetato não induziu apoptose espontânea, nem exacerbou apoptose induzida por LPS ou TNF- α . A mesma dose de butirato e propionato foi efetiva nas três situações, o bloqueio da sinalização dos receptores GPR41 e 43 com toxina pertussis não reverteu o resultado enquanto que a tricostatina A, um inibidor de HDACs de classe I e II, conseguiu

mimetizar os resultados obtidos com butirato e propionato (69). Esses dois estudos evidenciam que os AGCC podem estimular morte celular programada por diferentes mecanismos que podem depender das doses utilizadas.

Uma crítica associada aos experimentos que mostram efeitos pró-apoptóticos dos AGCC é de que as doses utilizadas *in vitro* estão quase sempre muito acima das concentrações aferidas na corrente sanguínea. Os resultados obtidos nesses estudos poderiam refletir um efeito tóxico dessas altas concentrações que poderia em muito diferir das ações fisiológicas desses compostos. Deve-se considerar, no entanto, que as concentrações séricas desses compostos podem apresentar grandes variações relacionadas à dieta, consumo de álcool ou doenças metabólicas (70-72). Além disso, as concentrações encontradas nos cólons por vezes até superam às utilizadas em estudos com linhagens derivadas de células dos cólons o que corrobora especulações de que os AGCC poderiam responder pelos efeitos anticancerígenos associados às dietas ricas em fibras. Por fim deve-se considerar a possibilidade de uso farmacêutico desses compostos com doses mais elevadas para obter resultados mais significativos.

1.5 MICROGLIA

Classicamente descritas como macrófagos residentes do SNC, as células da microglia surgem inicialmente da vesícula vitelina e depois de precursores mielóides que migram para o SNC durante o período embrionário. No SNC,

rapidamente se espalham por cérebro e medula espinhal formando uma população que se autorrenova por toda a vida (73). No entanto, quando o SNC é acometido por processos inflamatórios, ocorre recrutamento de células imunes da corrente sanguínea o que leva a formação de infiltrados formados tanto por microglia quanto por monócitos/macrófagos que, quando estabelecidos, são difíceis de distinguir da microglia residente porque apresentam o mesmo padrão de expressão de marcadores celulares (74).

Tal como outros fagócitos mononucleares, a microglia tem a capacidade de expressar diversas citocinas, quimiocinas, moléculas coestimulatórias e TLRs entre outros (74). Entretanto, quando inativada, a microglia difere de outros macrófagos por apresentar menor expressão de moléculas pró-inflamatórias sendo a principal diferença sua baixa expressão de moléculas de MHC de classe II em relação a macrófagos infiltrantes (75). A necessidade de manutenção de fenótipo menos responsivo por parte da microglia pode ser explicada pela necessidade de manter a delicada homeostase do SNC, um fenótipo mais “responsivo” poderia facilmente ativar e cronificar processos inflamatórios exacerbando danos teciduais e sequelas neurológicas. Portanto, mecanismos responsáveis por manter a microglia nesse estado de quiescência fazem-se necessários para preservar o tecido neuronal e respondem pelas principais diferenças entre a microglia e os demais fagócitos mononucleares. Talvez o mais importante mecanismo de manutenção desse estado seja a expressão do microRNA 124 (miRNA-124). Esse microRNA é expresso pela microglia, mas não por monócitos/macrófagos periféricos. Sua expressão mantém essas células em seu estado de baixa responsividade com baixa expressão CD45 e

de MHC de classe II. A transfecção do miRNA-124 em macrófagos derivados de medula óssea resulta em fenótipo semelhante ao da microglia com baixa expressão das mesmas moléculas e com maior resistência à ativação. O estímulo inflamatório com LPS ou INF- γ suprime a expressão de miRNA-124 permitindo à microglia assumir fenótipo ativado com alta expressão de moléculas pró-inflamatórias (76).

Inicialmente essas células foram descritas como células “em repouso” que permaneciam inativas até o momento em que alguma injúria ao SNC iniciava sua atividade. Assim existiam dois conceitos de microglia “em repouso” em contraposição à microglia “ativada” (77). Estudos recentes mostraram que, ao contrário da visão pré-estabelecida, a microglia “em repouso” é na verdade célula de grande atividade que emite processos que escaneiam as superfícies celulares do SNC sendo capazes de avaliar toda a superfície interna do SNC a cada 12 horas (78). Essa descoberta levou a uma nova visão sobre a microglia que, de células em repouso, passaram a ser vistas como células em “estado de vigilância”. Mais que uma simples curiosidade, essa descoberta aumentou o interesse por possíveis funções da microglia no desenvolvimento em processos fisiológicos (79).

O interesse pela microglia aumentou à medida que aumentou o conhecimento sobre a importância da inflamação em processos patológicos do SNC. Ficou evidente que, em diversas doenças, a patologia inicia por uma disfunção da microglia que lesa secundariamente os neurônios. Mais do que ajudar na elucidação de fisiopatologia de doenças neurológicas, os estudos sobre a microglia auxiliaram também na compreensão de doenças psiquiátricas antes vistas como “simples” alterações de neurotransmissores. A presença de comportamento

excessivo de limpeza corporal em camundongos foi sugerida como modelo de transtorno obsessivo compulsivo (TOC). Camundongos com mutações no fator de transcrição Homeo-box-b8 (Hoxb8) apresentam esse distúrbio comportamental que é caracterizado não apenas por comportamento excessivo de autolimpeza como também pela limpeza excessiva de outros animais do grupo. A perda de função dessa proteína na microglia resulta no comportamento anormal que pode ser revertido pela substituição da forma mutante por microglia normal. É interessante o fato de que a expressão desse fator de transcrição não é uniforme por todo SNC, estando presente em diversas áreas, entre elas córtex orbitofrontal, giro do cíngulo anterior e núcleo caudado que, em pacientes com TOC, foram associadas a alterações metabólicas (80, 81).

Um exemplo da importância da microglia em processos patológicos vem do estudo da Síndrome de Rett. Essa síndrome é doença ligada ao cromossomo X cujo gene responsável, MECP-2, foi também associado ao espectro autista (82). Foi demonstrado que a microglia com deficiência do gene MECP-2 libera quantidades excessivas de glutamato que lesam neurônios (83). No modelo animal a irradiação do crânio seguida de transferência adotiva de medula de animais normais resultou na substituição da microglia alterada por microglia “tipo selvagem” com melhora clínica e aumento da sobrevivência (84).

A liberação de glutamato pela microglia também foi apontada como mecanismo de lesão em outros modelos de doença. Na esclerose múltipla (EM) o glutamato parece ser uma fonte importante de dano tecidual. Evidências de estudos clínicos e experimentais corroboram essa hipótese. Níveis aumentados de

glutamato são encontrados em líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com EM ativa em comparação com controles saudáveis ou pacientes com EM sem lesões ativas. Em pacientes com EM secundariamente progressiva, níveis elevados de glutamato no LCR foram associados a pior evolução clínica do déficit neurológico (85, 86). Através de técnica de espectroscopia por ressonância magnética foi possível demonstrar a presença de níveis elevados de glutamato em lesões agudas e na substância branca de pacientes com EM (87). Existem várias possibilidades para explicar a origem do excesso de glutamato presente nas lesões de EM. Uma hipótese é que a microglia e macrófagos infiltrantes do SNC liberam glutamato quando ativados. De fato, quando ativados por LPS, microglia e macrófagos liberam grandes quantidades de glutamato que é produzido pela ação da glutaminase, enzima responsável por catalisar a conversão de glutamina em glutamato mais amônia (88-90). A presença de glutamato em excesso leva a perda neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica. O bloqueio farmacológico da ação do glutamato reduz a progressão da doença no modelo animal tanto de doença aguda quanto na fase secundariamente progressiva (91, 92).

A identificação de compostos químicos capazes de atenuar a ativação inflamatória da microglia pode gerar benefícios relevantes para pacientes com doenças do SNC. O acetato parece ser o candidato ideal entre os AGCC, pois é encontrado em maiores concentrações séricas. Em relação a outros fármacos esse composto tem a vantagem de ser um derivado da dieta o que leva a questionamentos sobre possível papel das fibras alimentares não apenas na prevenção de doenças dos cólons, mas também na prevenção de doenças do SNC.

1.6 AUTOFAGIA E IMUNIDADE DO SNC

Autofagia é termo genérico que define processo celular pelo qual partes de conteúdo citoplasmático é degradado por lisossomos. Ocorre tanto em organismos unicelulares quanto em pluricelulares, nesses últimos ocorrendo em todos os tipos de células(93).

Existem 3 classes de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas(93).

Na microautofagia os lisossomos internalizam pequenas partes de citoplasma engolfando-as diretamente através da invaginação da membrana lisossomal(93).

Na autofagia mediada por chaperonas proteínas malformadas são diretamente translocadas para o lúmen lisossomal(93).

A macroautofagia é a forma mais estudada de autofagia. É caracterizada pela presença de autofagossomos que são membranas responsáveis por isolar partes do citoplasma incluindo organelas e material solúvel. Os autofagossomos fundem-se com lisossomos formando, assim, os autolisossomos onde o material englobado é degradado(93).

Neste texto, o termo autofagia será utilizado como sinônimo de macroautofagia.

A mais óbvia função da autofagia é manter a viabilidade celular em situações de privação de nutrientes. No entanto, é errado entender autofagia como simples processo de geração de energia. O processo inicial de indução da autofagia começa antes que os estoques de energia estejam exauridos. Em condições de privação o anabolismo proteico é inibido, porém a síntese de algumas proteínas é mantida ou mesmo aumentada. Essas proteínas são essenciais para a adaptação da célula às condições de privação nutricional, por exemplo: enzimas antioxidantes, proteínas da cadeia respiratória e enzimas lisossomais (94, 95). De fato, a privação de nitrogênio e aminoácidos é o estímulo que induz autofagia mais fortemente e seu principal produto são aminoácidos oriundos das organelas degradadas. Quando os níveis intracelulares de aminoácidos são restaurados à normalidade, a autofagia é inibida. Dessa forma a autofagia funciona como um mecanismo de “feedback” negativo que mantém níveis adequados de aminoácidos permitindo a síntese de proteínas essenciais para adaptação às condições de privação (96).

No fígado, os aminoácidos gerados pela processo autofágico desempenham importante papel na gliconeogênese. Os aminoácidos produzidos pela degradação de organelas são convertidos em glicose via gliconeogênese contribuindo de forma significativa na manutenção dos níveis séricos de glicose. Em modelo murino, quando a autofagia é bloqueada via deleção de ATG7, os animais “knockouts” são capazes de manter níveis glicêmicos semelhantes aos controles selvagens durante as primeiras 24 horas de privação de alimentos. Em seguida, apesar da manutenção da privação de alimentos, os controles elevam seus níveis glicêmicos enquanto os “knockouts” evoluem com redução contínua da glicemia sanguínea.

Logo, fica claro o papel da autofagia na gliconeogênese hepática e manutenção da glicemia (97).

A autofagia permite ainda gerar energia na forma de ATP. Os aminoácidos liberados pelo processo podem ser convertidos em intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O bloqueio da autofagia em células tumorais via deleção de ATG5 resultou em diminuição dos níveis de metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos que são produzidos exclusivamente pelas mitocôndrias (citrato, aconitrato, and isocitrato). O mecanismo subjacente a esse processo parece ser um bloqueio da capacidade das mitocôndrias em converter piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e citrato. De fato, as células tumorais deficientes de ATG5 mostraram respiração mitocondrial deficiente o que resultou em acentuada redução dos níveis de ATP e aumento dos níveis de AMP em resposta a privação de nutrientes (98).

A autofagia também é importante no aproveitamento dos estoques de gordura nos hepatócitos. Em condições de privação nutricional, os estoques de gordura na forma de gotículas de triglicérides são hidrolisados liberando ácidos graxos. A autofagia funciona paralelamente à hidrólise degradando gotículas gordurosas por via lisossomal permitindo maior liberação de ácidos graxos livres para β -oxidação (99).

Uma vez induzida autofagia, uma sequência de eventos intracitoplasmáticos é desencadeada iniciando o englobamento de partes do conteúdo citoplasmático e formação de um fagoporo, culminando na fusão dos autofagossomos com os lisossomos (100). O processo é complexo e altamente regulado. Inicialmente

ocorre a formação de um fagoporo que sofre processo de alongação para se transformar em um autofagossomo.

No processo de alongação a proteína ATG12 é conjugada à ATG5 pela ação da proteína ATG7. O complexo ATG5-ATG12 se associa aos fagoporos, mas é liberado e, por isso, está ausente nos autofagossomos. Em outra reação a molécula LC3-I é conjugada a lipídeos fosfatidil etanolamina pela proteína ATG7 dessa maneira formando LC3-II. Ao contrário do complexo ATG5-ATG12, a LC3 permanece ligada aos autofagossomos. Uma vez formados, os autofagossomos são transportados até os lisossomos pelos microtúbulos permitindo a fusão autofagossomo-lisossomo e a finalização do processo (101).

Embora a autofagia seja, em princípio, induzida por estímulos específicos, em condições normais de funcionamento 1 a 1,5% das proteínas celulares sofrem catabolismo autofágico a cada hora. Essa autofagia basal constitui importante mecanismo de “controle de qualidade” das organelas citoplasmáticas e é fundamental para a homeostase de diferentes tipos de células como hepatócitos e neurônios. Evidências indicam que a autofagia basal é seletiva tendo como alvo organelas diferentes dependendo da célula onde ocorre (93).

A proteína p62, também conhecida como sequestrassomo 1/SQSTM1, é um conhecido substrato para autofagia seletiva. É universalmente expressa em células de animais. No desenvolvimento do processo autofágico, a p62 interage com a LC3 sendo incorporada ao autofagossomo e, posteriormente, degradada quanto da fusão deste com os lisossomos (102, 103). Evidências associam a p62 à autofagia

seletiva de agregados de proteínas malformadas (104, 105). Quando a autofagia é bloqueada, ocorre acúmulo de p62 na célula. Por outro lado, a indução de autofagia diminui as quantidades intracelulares de p62 (106, 107). De fato, agregados de proteínas malformadas contendo p62 e ubiquitina são encontrados em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (108). Essa proteína pode ainda influenciar o funcionamento celular através de interações com outras proteínas não relacionadas à autofagia. Ela pode, por exemplo, se associar ao TRAF6 (do inglês: TNF receptor-associated factor 6) dessa forma influenciando na ativação celular via NF- κ B ou atuar na agregação da caspase 8 facilitando a apoptose (109). Por outro lado, em macrófagos estimulados por INF- γ ou CpGs a p62 inibe a expressão de diversas citocinas inflamatórias (IL-12p40, TNF- α , IL-6, IL-1 β e INF- β) enquanto a inibição da síntese da p62 leva a aumento significativo da síntese dessas mesmas citocinas (110).

1.7 RELAÇÃO ENTRE AGCC E AUTOFAGIA

A relação entre AGCC e autofagia foi pouco estudada até o momento. Um único estudo mostrou indução de autofagia pelo propionato. Tang et al. mostraram que o pré-tratamento com propionato induz disfunção mitocondrial com quebra na produção de ATP levando à inibição da via mTorc1 e, dessa forma, estimulando mitofagia. Os autores concluíram que esse efeito pode ser prejudicial em futuras

aplicações de AGCC no tratamento de câncer. Em nenhum momento os autores investigam os mecanismos de ação “clássicos” dos AGCC como ativação de receptores e inibição de histonas (111).

O acetato na forma de acetil-CoA também foi relacionado à autofagia por ser fonte de nutrientes para a célula. Níveis reduzidos de acetil-CoA induzem autofagia por funcionarem como condição de privação de nutrientes. A reposição dos níveis de Acetil-CoA, ao contrário, inibem autofagia por indicar abundância de nutrientes para a célula (112). Portanto, variações fisiológicas dos níveis de Acetil-CoA intracelular são fundamentais na regulação da autofagia. Uma vez que o acetato estimula a produção de acetil-CoA deve, em princípio, inibir a autofagia.

Embora referências diretas a possíveis ações dos AGCC na autofagia sejam escassas, diversos estudos fazem supor que esses compostos devem interferir direta e indiretamente na regulação da autofagia.

Em primeiro lugar, sendo esses compostos fonte de energia para as células, devem inibir autofagia via inibição da via da mTOR. Isso pode ser particularmente importante nos colonócitos que recebem abundantes quantidades de AGCC oriundas da fermentação nos cólons (11).

Por fim, dadas as estreitas relações entre os receptores GPR41 e 43 e o metabolismo energético, pode-se especular interação entre a ativação desses receptores e a regulação da autofagia (113).

acetato ao interior dos neurônios, pois é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e a membrana plasmática sem a necessidade de transportadores específicos (158).

Na prática científica, é comum apontar em um objetivo inicial e terminar em um objetivo completamente diferente. Nosso objetivo inicial era estudar o efeito da leptina na microglia, o acetato, representava uma parte menos importante do projeto. Todavia, passou de coadjuvante a ator principal. Agora concluímos que modula a ativação inflamatória da microglia pelo LPS e induz autofagia, sendo esse último achado o mais relevante. Esperamos que no futuro esse AGCC seja testado e aprovado para uso clínico, pois, na verdade, o verdadeiro objetivo desse e de qualquer outro estudo científico não é estudar a ativação de uma célula, mas melhorar a qualidade de vida de seres humanos.

8 CONCLUSÕES

O acetato possui efeitos imunomoduladores que não podem ser definidos como pró ou anti-inflamatórios, pois pode, ao mesmo tempo, estimular e inibir a expressão de citocinas inflamatórias. Os efeitos citoprotetores ocorrem por ação direta nas células, ou seja, não são secundários ao efeito imunomodulador.

Concluimos ainda que:

- O acetato estimula de forma dose dependente a produção de TNF- α em células da linhagem C8-B4 ativadas com LPS. O estímulo à produção de TNF- α ocorre por mecanismo epigenético. A participação dos receptores GPR nesse processo não foi completamente descartada.
- O acetato também estimula a produção de TNF- α em culturas primárias de microglia de camundongos.
- O acetato inibe a produção de IL-6 em células da linhagem C8-B4 de microglia ativadas por LPS.
- O acetato melhora a viabilidade celular de células da linhagem C8-B4 de microglia ativadas por LPS. O mecanismo citoprotetor responsável pela melhora da viabilidade celular é a indução de autofagia.
- O acetato induz autofagia por mecanismo epigenético que é independente dos receptores de AGCC, GPR41 e 43.

REFERENCIAS*

1. Dickinson JR. *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*, 2nd Edition. 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor and Francis; 1999.
2. Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R, Van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):366-84.
3. Cummings JH. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet*. 1983 May 28;1(8335):1206-9.
4. Miller TL, Wolin MJ. Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr*. 1979 Jan;32(1):164-72.
5. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991 Jun;70(6):443-59.
6. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1031-64.
7. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*. 1981 Sep;22(9):763-79.
8. Cummings JH, Englyst HN, Wiggins HS. The role of carbohydrates in lower gut function. *Nutr Rev*. 1986 Feb;44(2):50-4.
9. Cummings JH, Englyst HN. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr*. 1987 May;45(5 Suppl):1243-55.
10. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Mar;40(3):235-43.
11. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998 Jun;12(6):499-507.
12. Owens FN, Isaacson HR. Ruminant microbial yields: factors influencing synthesis and bypass. *Fed Proc*. 1977 Feb;36(2):198-202.
13. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 May;294(1):1-8.
14. Meijer K, de Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Nov;13(6):715-21.

15. Hallert C, Bjorck I, Nyman M, Pousette A, Granno C, Svensson H. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Mar;9(2):116-21.
16. Scheppach W, Muller JG, Boxberger F, Dusel G, Richter F, Bartram HP, et al. Histological changes in the colonic mucosa following irrigation with short-chain fatty acids. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997 Feb;9(2):163-8.
17. Scheppach W. Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci*. 1996 Nov;41(11):2254-9.
18. Steinhart AH, Hiruki T, Brzezinski A, Baker JP. Treatment of left-sided ulcerative colitis with butyrate enemas: a controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996 Oct;10(5):729-36.
19. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11312-9.
20. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003 Jul 11;278(28):25481-9.
21. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282-6.
22. Ge H, Li X, Weizmann J, Wang P, Baribault H, Chen JL, et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*. 2008 Sep;149(9):4519-26.
23. Zaibi MS, Stocker CJ, O'Dowd J, Davies A, Bellahcene M, Cawthorne MA, et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett*. 2010 Jun 3;584(11):2381-6.
24. Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 27;101(4):1045-50.
25. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

26. Bellahcene M, O'Dowd JF, Wargent ET, Zaibi MS, Hislop DC, Ngala RA, et al. Male mice that lack the G-protein-coupled receptor GPR41 have low energy expenditure and increased body fat content. *Br J Nutr.* 2013 May 28;109(10):1755-64.
27. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 May;4(5):371-9.
28. Landman RE, Puder JJ, Xiao E, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Mar;88(3):1285-91.
29. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998 Aug 27;394(6696):897-901.
30. Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 5;102(14):5150-5.
31. Orbak Z, Ertekin V, Akcay F, Ozkan B, Ors R. Serum leptin levels in neonatal bacterial septicemia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003 Jun;16(5):727-31.
32. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 12;110(11):4410-5.
33. Weber M, Pehl U, Breer H, Strotmann J. Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *J Neurosci Res.* 2002 Apr 15;68(2):176-84.
34. Rafalzik S, Pehl U, Ott D, Strotmann J, Wolff M, Gerstberger R. Cholinergic signal transduction in the mouse sphenopalatine ganglion. *Brain Res.* 2008 Nov 19;1241:42-55.
35. Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev.* 2011 Apr;91(2):603-49.
36. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron.* 2008 Dec 26;60(6):961-74.
37. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):263-71.
38. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):41-5.
39. Berndsen CE, Denu JM. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol.* 2008 Dec;18(6):682-9.

40. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):32-42.
41. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Mar;983:84-100.
42. Sheikh BN. Crafting the brain - role of histone acetyltransferases in neural development and disease. *Cell Tissue Res.* 2014 Jun;356(3):553-73.
43. Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discov Today.* 2009 Oct;14(19-20):942-8.
44. Cousens LS, Gallwitz D, Alberts BM. Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J Biol Chem.* 1979 Mar 10;254(5):1716-23.
45. Soliman ML, Rosenberger TA. Acetate supplementation increases brain histone acetylation and inhibits histone deacetylase activity and expression. *Mol Cell Biochem.* 2011 Jun;352(1-2):173-80.
46. Soliman ML, Smith MD, Houdek HM, Rosenberger TA. Acetate supplementation modulates brain histone acetylation and decreases interleukin-1beta expression in a rat model of neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2012;9:51.
47. Brissette CA, Houdek HM, Floden AM, Rosenberger TA. Acetate supplementation reduces microglia activation and brain interleukin-1beta levels in a rat model of Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation.* 2012;9:249.
48. Soliman ML, Puig KL, Combs CK, Rosenberger TA. Acetate reduces microglia inflammatory signaling in vitro. *J Neurochem.* 2012 Nov;123(4):555-67.
49. Soliman ML, Combs CK, Rosenberger TA. Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Mar;8(1):287-300.
50. Saemann MD, Bohmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000 Dec;14(15):2380-2.
51. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2007 Jan;7(1):70-7.

52. Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.* 2003 Aug 15;73(13):1683-90.
53. Bocker U, Nebe T, Herweck F, Holt L, Panja A, Jobin C, et al. Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. *Clin Exp Immunol.* 2003 Jan;131(1):53-60.
54. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Hebeda CB, Farsky SH, Curi R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci (Lond).* 2009 Nov;117(9):331-8.
55. Maa MC, Chang MY, Hsieh MY, Chen YJ, Yang CJ, Chen ZC, et al. Butyrate reduced lipopolysaccharide-mediated macrophage migration by suppression of Src enhancement and focal adhesion kinase activity. *J Nutr Biochem.* 2010 Dec;21(12):1186-92.
56. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol.* 2009 Nov 28;15(44):5549-57.
57. Sina C, Gavrilova O, Forster M, Till A, Derer S, Hildebrand F, et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7514-22.
58. Huuskonen J, Suuronen T, Nuutinen T, Kyrylenko S, Salminen A. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol.* 2004 Mar;141(5):874-80.
59. Kim HS, Whang SY, Woo MS, Park JS, Kim WK, Han IO. Sodium butyrate suppresses interferon-gamma-, but not lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in microglia. *J Neuroimmunol.* 2004 Jun;151(1-2):85-93.
60. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut.* 2000 Sep;47(3):397-403.
61. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology.* 2000 Apr;118(4):724-34.
62. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 1998 Aug;115(2):357-69.

63. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998 Apr;42(4):477-84.
64. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*. 2001 Aug;130(2):363-9.
65. Comalada M, Bailon E, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Aug;132(8):487-97.
66. Fung KY, Brierley GV, Henderson S, Hoffmann P, McColl SR, Lockett T, et al. Butyrate-induced apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells includes induction of a cell stress response. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1860-9.
67. Fung KY, Lewanowitsch T, Henderson ST, Priebe I, Hoffmann P, McColl SR, et al. Proteomic analysis of butyrate effects and loss of butyrate sensitivity in HT29 colorectal cancer cells. *J Proteome Res*. 2009 Mar;8(3):1220-7.
68. Bailon E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Rodriguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, et al. Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology*. 2010 Nov;215(11):863-73.
69. Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*. 2010 Jun;26(6):653-61.
70. Siler SQ, Neese RA, Hellerstein MK. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. *Am J Clin Nutr*. 1999 Nov;70(5):928-36.
71. Thompson GN, Walter JH, Bresson JL, Ford GC, Lyonnet SL, Chalmers RA, et al. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. *Metabolism*. 1990 Nov;39(11):1133-7.
72. Trauner DA, Nyhan WL, Sweetman L. Short-chain organic acidemia and Reye's syndrome. *Neurology*. 1975 Mar;25(3):296-8.
73. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):841-5.
74. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461-553.

75. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):374-89.
76. Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):64-70.
77. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):312-8.
78. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8.
79. Eyo UB, Dailey ME. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Jun;8(3):494-509.
80. Greer JM, Capecchi MR. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*. 2002 Jan 3;33(1):23-34.
81. Graybiel AM, Rauch SL. Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron*. 2000 Nov;28(2):343-7.
82. Derecki NC, Privman E, Kipnis J. Rett syndrome and other autism spectrum disorders--brain diseases of immune malfunction? *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):355-63.
83. Maezawa I, Jin LW. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J Neurosci*. 2010 Apr 14;30(15):5346-56.
84. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SB, Guyenet PG, et al. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*. 2012 Apr 5;484(7392):105-9.
85. Sarchielli P, Greco L, Floridi A, Gallai V. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*. 2003 Aug;60(8):1082-8.
86. Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempinski OS. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest*. 1997 Dec;27(12):1038-43.
87. Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*. 2005 May;128(Pt 5):1016-25.
88. Piani D, Frei K, Do KQ, Cuenod M, Fontana A. Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett*. 1991 Dec 9;133(2):159-62.

89. Piani D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol.* 1992 Sep;22(9):2429-36.
90. Yawata I, Takeuchi H, Doi Y, Liang J, Mizuno T, Suzumura A. Macrophage-induced neurotoxicity is mediated by glutamate and attenuated by glutaminase inhibitors and gap junction inhibitors. *Life Sci.* 2008 May 23;82(21-22):1111-6.
91. Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1532-43.
92. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2000 Jan;6(1):67-70.
93. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728-41.
94. Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem.* 2005 Sep 9;280(36):31582-6.
95. Suzuki SW, Onodera J, Ohsumi Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One.* 2011;6(2):e17412.
96. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 2010 Jun 17;465(7300):942-6.
97. Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K, Hiraoka Y, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy.* 2011 Jul;7(7):727-36.
98. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2011 Mar 1;25(5):460-70.
99. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1131-5.
100. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011 Sep 2;146(5):682-95.
101. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010 Oct;90(4):1383-435.

102. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011 Mar;7(3):279-96.
103. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:125-56.
104. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):603-14.
105. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1149-63.
106. Bartlett BJ, Isakson P, Lewerenz J, Sanchez H, Kotzebue RW, Cumming RC, et al. p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy*. 2011 Jun;7(6):572-83.
107. Cui J, Bai XY, Shi S, Cui S, Hong Q, Cai G, et al. Age-related changes in the function of autophagy in rat kidneys. *Age (Dordr)*. 2012 Apr;34(2):329-39.
108. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):255-63.
109. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1001-4.
110. Kim JY, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):2131-40.
111. Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D. Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 2011 Apr;18(4):602-18.
112. Schroeder S, Pendl T, Zimmermann A, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Ruckenstein C, et al. Acetyl-coenzyme A: a metabolic master regulator of autophagy and longevity. *Autophagy*. 2014 Jul;10(7):1335-7.
113. Inoue D, Tsujimoto G, Kimura I. Regulation of Energy Homeostasis by GPR41. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:81.

114. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3823-31.
115. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Aug;25(4):453-72.
116. Shin S, Brodsky IE. The inflammasome: Learning from bacterial evasion strategies. *Semin Immunol*. 2015 Mar;27(2):102-10.
117. Alliot F, Marty MC, Cambier D, Pessac B. A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Brain Res Dev Brain Res*. 1996 Aug 20;95(1):140-3.
118. Xu X, Kim JA, Zuo Z. Isoflurane preconditioning reduces mouse microglial activation and injury induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Neuroscience*. 2008 Jun 26;154(3):1002-8.
119. Koenke E, Witt O, Oehme I. HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities. *Cells*. 2015;4(2):135-68.
120. Donohoe DR, Bultman SJ. Metaboloepigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J Cell Physiol*. 2012 Sep;227(9):3169-77.
121. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1076-80.
122. Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med*. 2010 Oct;14(10):2448-59.
123. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):313-22.
124. Dupere-Richer D, Kinal M, Menasche V, Nielsen TH, Del Rincon S, Pettersson F, et al. Vorinostat-induced autophagy switches from a death-promoting to a cytoprotective signal to drive acquired resistance. *Cell Death Dis*. 2013;4:e486.
125. Xie M, Kong Y, Tan W, May H, Battiprolu PK, Pedrozo Z, et al. Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation*. 2014 Mar 11;129(10):1139-51.

126. Eshak ES, Iso H, Date C, Kikuchi S, Watanabe Y, Wada Y, et al. Dietary fiber intake is associated with reduced risk of mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women. *J Nutr*. 2010 Aug;140(8):1445-53.
127. Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1266-89.
128. Papathanasopoulos A, Camilleri M. Dietary fiber supplements: effects in obesity and metabolic syndrome and relationship to gastrointestinal functions. *Gastroenterology*. 2010 Jan;138(1):65-72 e1-2.
129. Park Y, Subar AF, Hollenbeck A, Schatzkin A. Dietary fiber intake and mortality in the NIH-AARP diet and health study. *Arch Intern Med*. 2011 Jun 27;171(12):1061-8.
130. Qiu C, Coughlin KB, Frederick IO, Sorensen TK, Williams MA. Dietary fiber intake in early pregnancy and risk of subsequent preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2008 Aug;21(8):903-9.
131. Franco OH, Burger H, Lebrun CE, Peeters PH, Lamberts SW, Grobbee DE, et al. Higher dietary intake of lignans is associated with better cognitive performance in postmenopausal women. *J Nutr*. 2005 May;135(5):1190-5.
132. Smith AP, Wilds A. Effects of cereal bars for breakfast and mid-morning snacks on mood and memory. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60 Suppl 4:63-9.
133. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism*. 2012 Aug;61(8):1058-66.
134. Birt DF, Phillips GJ. Diet, Genes, and Microbes: Complexities of Colon Cancer Prevention. *Toxicol Pathol*. 2013 Oct 15.
135. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
136. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods*. 2000 Mar 15;96(2):147-52.
137. Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem*. 2008 Apr 1;103(5):1452-63.
138. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem*. 2005 Jul;94(1):1-14.

139. Moreira TJ, Pierre K, Maekawa F, Repond C, Cebere A, Liljequist S, et al. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Jul;29(7):1273-83.
140. Berl S, Frigyesi TL. The turnover of glutamate, glutamine, aspartate and GABA labeled with [1-14C]acetate in caudate nucleus, thalamus and motor cortex (cat). *Brain Res.* 1969 Feb;12(2):444-55.
141. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th, updated edition ed. Saunders E, editor.; 2005.
142. Patel AB, de Graaf RA, Mason GF, Rothman DL, Shulman RG, Behar KL. The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 12;102(15):5588-93.
143. Licciardi PV, Ververis K, Karagiannis TC. Histone deacetylase inhibition and dietary short-chain Fatty acids. *ISRN Allergy.* 2011;2011:869647.
144. Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem.* 2008 Sep;19(9):587-93.
145. Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 2002 Mar 1;539(Pt 2):361-71.
146. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* 2010 Mar 3;29(5):969-80.
147. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, et al. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4415-23.
148. Kang ZH, Wang CY, Zhang WL, Zhang JT, Yuan CH, Zhao PW, et al. Histone deacetylase HDAC4 promotes gastric cancer SGC-7901 cells progression via p21 repression. *PLoS One.* 2014;9(6):e98894.
149. Peixoto P, Castronovo V, Matheus N, Polese C, Peulen O, Gonzalez A, et al. HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells. *Cell Death Differ.* 2012 Jul;19(7):1239-52.
150. Roccaro AM, Sacco A, Jia X, Azab AK, Maiso P, Ngo HT, et al. microRNA-dependent modulation of histone acetylation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2010 Sep 2;116(9):1506-14.

151. Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, et al. GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*. 2012 Apr 27;336(6080):477-81.
152. Pietrocola F, Lachkar S, Enot DP, Niso-Santano M, Bravo-San Pedro JM, Sica V, et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ*. 2014 Mar;22(3):509-16.
153. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544.
154. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov 30;48(4):612-26.
155. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2008 Oct;14(10):1097-105.
156. Rubinsztein DC, Bento CF, Deretic V. Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. *J Exp Med*. 2015 Jun 29;212(7):979-90.
157. Segel R, Anikster Y, Zevin S, Steinberg A, Gahl WA, Fisher D, et al. A safety trial of high dose glyceryl triacetate for Canavan disease. *Mol Genet Metab*. 2011 Jul;103(3):203-6.
158. Tsen AR, Long PM, Driscoll HE, Davies MT, Teasdale BA, Penar PL, et al. Triacetin-based acetate supplementation as a chemotherapeutic adjuvant therapy in glioma. *Int J Cancer*. 2014 Mar 15;134(6):1300-10.