



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOINFORMÁTICA

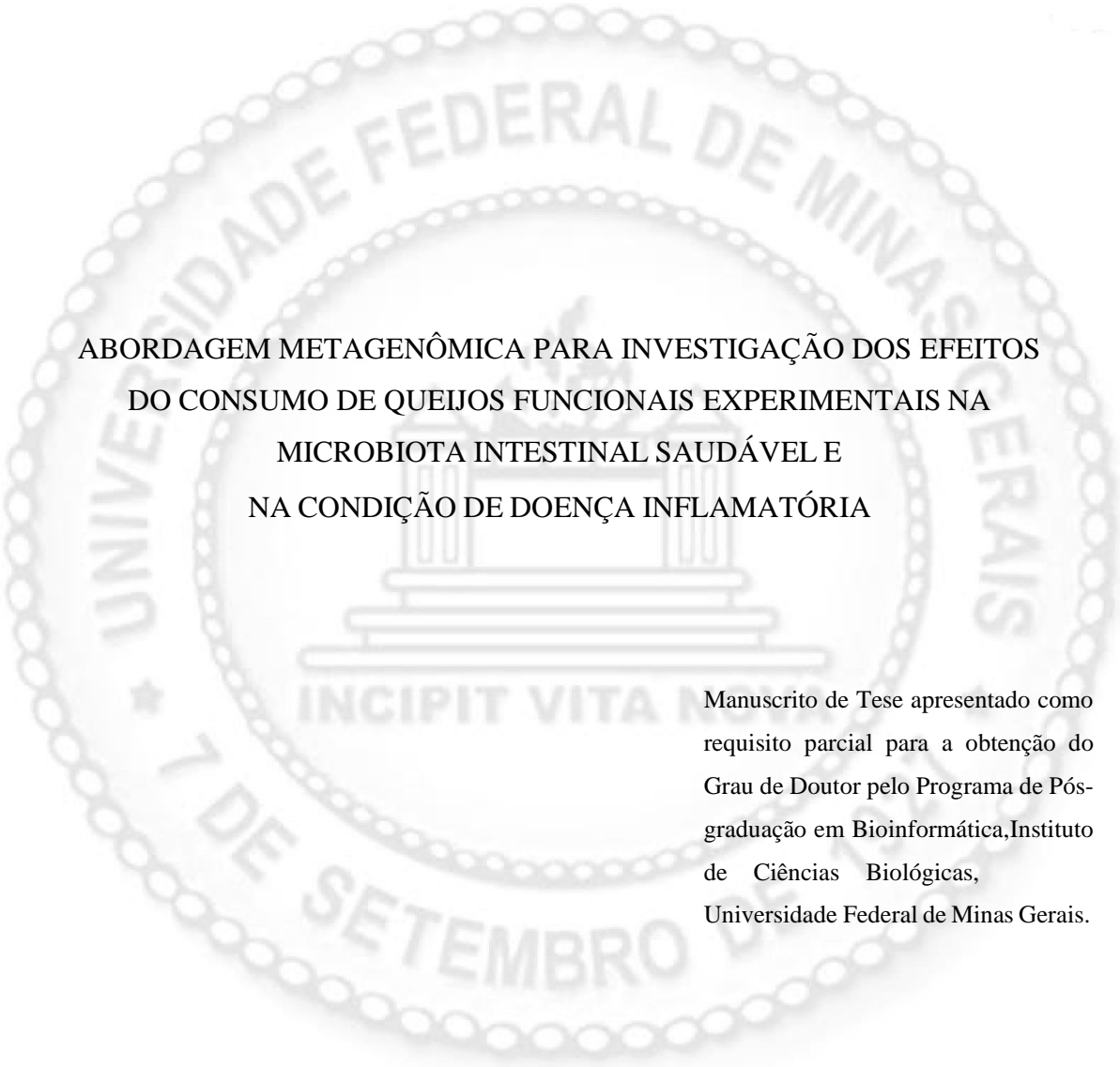
UF *m* G

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

ABORDAGEM METAGENÔMICA PARA INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS  
DO CONSUMO DE QUEIJOS FUNCIONAIS EXPERIMENTAIS NA  
MICROBIOTA INTESTINAL SAUDÁVEL E  
NA CONDIÇÃO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA

Belo Horizonte  
2023

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho



ABORDAGEM METAGENÔMICA PARA INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS  
DO CONSUMO DE QUEIJOS FUNCIONAIS EXPERIMENTAIS NA  
MICROBIOTA INTESTINAL SAUDÁVEL E  
NA CONDIÇÃO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA

Manuscrito de Tese apresentado como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Orientador:** Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Belo Horizonte  
2023

043

Carvalho, Rodrigo Dias de Oliveira.

Abordagem metagenômica para investigação dos efeitos do consumo de queijos funcionais experimentais na microbiota intestinal saudável e na condição de doença inflamatória [manuscrito] / Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. – 2023.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Alimento Funcional. 3. Probióticos. 4. Inflamassomos. 5. Microbioma Gastrointestinal. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA  
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho**

**"Abordagem metagenômica para investigação dos efeitos do consumo de queijos funcionais experimentais na microbiota intestinal saudável e na condição de doença inflamatória"**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof<sup>a</sup> Ana Maria Benko Iseppon  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Aristóteles Góes Neto  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Sandeep Tiwari  
Universidade Federal da Bahia

Dr. Rodrigo Profeta Silveira Santos  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 26 de abril de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Sandeep Tiwari, Usuário Externo**, em 26/04/2023, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Profeta Silveira Santos, Usuário Externo**, em 26/04/2023, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria Benko Iseppon, Usuário Externo**, em 26/04/2023, às 21:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Aristoteles Goes Neto, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2248370** e o código CRC **50FBFBA7**.

---

## RESUMO

A prevenção das doenças inflamatórias intestinais tem sido vislumbrada por meio de intervenções nutricionais. No entanto, o impacto dos alimentos funcionais na microbiota intestinal é uma importante questão, uma vez que mudanças na comunidade bacteriana comensal podem levar à inflamação. Além disso, a presença de microrganismos vivos em alimentos pode representar riscos de aquisição de resistência a antibióticos por bactérias da microbiota. Neste estudo, dois tipos de queijos experimentais foram investigados quanto aos seus efeitos na microbiota fecal de camundongos convencionais C57BL/6, tanto em estado de saúde como sob colite induzida por DSS. Um tipo foi fermentado por *Propionibacterium freudenreichii* 129, enquanto o outro queijo era do tipo Emmental contendo esta cepa probiótica e mais duas bactérias lácticas, *Lactobacillus delbrueckii* e *Streptococcus thermophilus*. O estudo descobriu que ambos os queijos não perturbaram a comunidade microbiana normal, enquanto o queijo Emmental aumentou a população de certos simbiontes, como *Romboutsia* e *Akkermansia*. Além disso, a análise de reconstrução de vias metabólicas revelou que *A. muciniphila* pode produzir acetato e cooperar com outras espécies comensais para produzir Indol e ácido gamma-aminobutírico quando camundongos saudáveis foram tratados com o queijo do tipo Emmental. No contexto da colite, consumir queijo de cepa única restaurou algumas das funções metabólicas do microbioma afetado, enquanto o queijo tipo Emmental promoveu o aumento de *Ligilactobacillus murinus*. Neste último, foram identificados genes envolvidos na produção de metabólitos e adesinas que podem ter atividade imunomodulatória. O estudo também realizou uma análise do resistoma, que revelou que genes de resistência a antibióticos não foram transferidos das bactérias utilizadas no preparo do queijo para a microbiota dos camundongos. No geral, os queijos experimentais foram considerados seguros em relação à transferência de genes de resistência. Além disso, o queijo tipo Emmental aumentou a capacidade da microbiota de produzir metabólitos que regulam o eixo intestino-cérebro, o que pode torná-lo uma terapia potencial para doenças neurodegenerativas inflamatórias. No contexto da colite, o estudo sugere que o queijo funcional Emmental tem propriedades anti-inflamatórias com base na promoção de proteínas de *Lg. murinus* com o sistema imune do hospedeiro.

**Palavras-chave:** Alimentos Funcionais, Probióticos, Inflamassoma, Microbioma intestinal, Metabólitos bioativos.

## ABSTRACT

The prevention of Inflammatory Bowel Diseases has been explored through nutritional interventions. However, the impact of interventions such as functional foods on the gut microbiota is a crucial concern, as changes in the commensal bacterial community can lead to colitis. Additionally, the risk of acquiring antibiotic resistance from foreign bacteria in food cannot be disregarded. In this study, two types of experimental cheeses were investigated for their effects on the fecal microbiota of conventional C57BL6 mice, both in a healthy state and under DSS-induced colitis. One type was fermented by *Propionibacterium freudenreichii* 129, while the other was an Emmental-type cheese containing this probiotic strain and two more, *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus*. The study found that both cheeses did not disrupt the normal microbial community, and the Emmental-type cheese increased the population of certain symbionts. Furthermore, metabolic pathway reconstruction analysis revealed that *Akkermansia muciniphila* may produce acetate and cope with other commensal species to produce Indole and gamma-Aminobutyric acid when healthy mice were treated with the Emmental cheese. In the context of colitis, consuming the Single-Strain cheese restored some of the impaired microbiome metabolic functions, while Emmental-type cheese promoted the increase of *Ligilactobacillus murinus*. The latter contains genes involved in the production of metabolites and adhesin proteins that may have potential immunomodulatory activity. The study also conducted a resistome analysis, which revealed that antibiotic resistance genes were not transferred from starter bacteria in the cheese to mice microbiota. Overall, the experimental cheeses were found to be safe regarding the transfer of antibiotic resistance genes to gut microbiota. Additionally, the Emmental-type cheese increased the microbiota's capacity to produce metabolites that regulate the gut-brain axis, which may make it a potential therapy for inflammatory neurodegenerative diseases. In the context of colitis, the study suggests that the functional Emmental cheese has anti-inflammatory properties based on its promotion of *Lg. murinus* interaction with the host.

**Keywords:** Functional foods, Probiotics, Inflammasome, Gut Microbiome, Bioactive metabolites, Metagenome Assembled Genomes.

## LISTA DE SIGLAS

AGCC - ácidos graxos de cadeia curta

DSS - sulfato de sódio Dextrano

GABA - ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GALT - *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GMP - glicomacropéptídeos

GPCR - receptores acoplados à proteína G

IBD – *Inflammatory Bowel Diseases*

IFN - interferon

IL - interleucina

HMP - *Human Microbiome Project*

LPS - lipopolissacarídeos

MAMP – *Microbe Associated Molecular Patterns*

MetaHIT - *Metagenomics of the Human Intestinal Tract*

OTU – *Operational Taxonomic Unit*

NAIP - proteínas inibidoras de apoptose neuronal

NF- $\kappa$ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLR- *Nucleotide-binding and oligomerization domain -like receptors*

RRP - receptores de reconhecimento de padrões

SNC - Sistema Nervoso Central

Th – *T helper cell*

TLR - *Toll-like receptors*

TNF - *Tumor necrosis factor*

TGI - Trato gastrointestinal



# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	7
<b>1.1 Microbiota intestinal</b> .....	7
<i>1.1.1 Formação e organização estrutural da microbiota</i> .....	7
<i>1.1.2 Funções e relações simbióticas com o hospedeiro</i> .....	9
<i>1.1.2.1 Produção de ácidos graxos de cadeia curta na regulação do metabolismo energético do TGI</i> .....	10
<i>1.1.2.3 Comunicação com o eixo intestino-cérebro</i> .....	10
<i>1.1.2.3 Interação da microbiota com o Sistema Imune de Mucosas</i> .....	11
<b>1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais</b> .....	14
<i>1.2.1 Disbiose associada as IBD</i> .....	14
<i>1.2.2 Intervenções terapêuticas das IBD</i> .....	16
<b>1.3 Alimentos funcionais</b> .....	17
<i>1.3.1 Uso de produtos lácteos fermentados no tratamento das IBD</i> .....	18
<b>1.4 Uso da metagenômica na investigação de microbiomas</b> .....	19
<b>2. Objetivos</b> .....	23
2.1 Objetivo Geral .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>3. Capítulo I</b> .....	24
<b>4. Conclusão</b> .....	57
<b>5. Perspectivas</b> .....	58
Referências .....	59
Apêndices .....	67

## 1. Introdução

### 1.1 Microbiota intestinal

O Trato Gastrointestinal (TGI) constitui um conjunto de órgãos, tecidos e outras estruturas anatômicas responsáveis pelo processo de digestão e transporte de alimento e de defesa contra toxinas e patógenos do meio externo. Por ser um ambiente rico em nutrientes, a superfície de mucosas que reveste o TGI inferior, do qual fazem parte os intestinos delgado e grosso, é colonizada por uma comunidade microbiana denominada microbiota intestinal (Fan e Pedersen 2021). Esta comunidade é composta por uma grande diversidade de microrganismos, principalmente bactérias. Por este motivo, elas vêm sendo mais estudadas, porém, a microbiota humana também pode incluir fungos, como *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp., e vírus, como bacteriófagos e vírus eucarióticos enquanto que protozoários e arqueias também podem estar presentes em menor quantidade (Rinninella et al. 2019).

A composição microbiana de cada indivíduo é única em comparação com a de todos os outros seres humanos, o que dificulta determinar com precisão o número de espécies bacterianas, no entanto, estima-se que esta compreenda cerca de 2000 espécies. Em termos de biomassa, estima-se que as bactérias comensais representam 1 à 2 kg do corpo humano e que atinjam populações de 100 trilhões, isto é, pelo menos duas vezes mais que o número de células dos órgãos e tecidos do hospedeiro (Thursby e Juge 2017; Martino et al. 2022; Syromyatnikov et al. 2022).

#### *1.1.1 Formação e organização estrutural da microbiota*

As espécies de microrganismos que compõem a microbiota intestinal podem ser autóctones, sendo capazes de colonizar o hospedeiro, ou alóctones, os quais não o habitam permanentemente. A maioria das espécies é autóctone, sendo bem adaptadas às condições do TGI, enquanto apenas uma ínfima parte vem do ambiente externo, como por exemplo através da dieta. Estas, em condições de homeostasia, não conseguem sobreviver facilmente ou competir por nichos com a microbiota residente (Thursby e Juge 2017).

A colonização do hospedeiro pelos microrganismos autóctones, inicia-se durante o nascimento, quando o infante é exposto à microbiota materna durante a passagem através do canal vaginal. Recentemente tem-se discutido também o

fenômeno do *imprinting* imunológico durante a gestação, na qual os metabólitos capazes de atravessar a placenta estimulam o sistema imune do feto, podendo interferir na composição da microbiota após o nascimento (Martino et al. 2022).

A composição inicial da microbiota intestinal é relativamente simples, sendo dominada por lactobacilos, entre outras espécies encontradas na mucosa vaginal da mãe e gradativamente evolui através de transições sucessivas até se tornar estável, ou seja, semelhante à microbiota dos adultos (Thursby e Juge 2017). Neste contexto, as espécies primo colonizadoras geralmente são anaeróbias facultativas resistentes à alta tensão de  $O_2$  e proporcionam a formação de um ambiente favorável para o estabelecimento de bactérias anaeróbicas restritas. Durante a amamentação, nutrientes e anticorpos do leite materno moldam a estrutura da microbiota, novamente promovendo a expansão de bactérias, principalmente as bifidobactérias e o filo Bacteroidetes, capazes de metabolizar oligossacarídeos do leite (Fan e Pedersen 2021). Após o desmame, a introdução de alimentos sólidos, tais como fibras vegetais na dieta, entre outros fatores ambientais relacionados ao estilo de vida, e aspectos culturais são responsáveis pela ascensão da diversidade microbiana (Zmora, Suez, e Elinav 2019). Estudos recentes mostram que o microbioma intestinal de adultos saudáveis é dominado pelos filos bacterianos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia (Ghosh e Pramanik 2021). Os dois primeiros geralmente representam mais que 90% da microbiota intestinal. O filo Firmicutes é composto por cerca de 200 gêneros diferentes, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*. O filo Bacteroidetes consiste em gêneros predominantes, como *Bacteroides* e *Prevotella*. A proporção média de Proteobacteria é de cerca de 10-15% da microbiota total, representado principalmente pelo grupo das Enterobacterias tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, entre outros. No filo Verrucomicrobia, atualmente só se conhece um gênero, denominado *Akkermansia*, capaz de colonizar o TGI humano, cuja proporção de é de 1-6% (Kim et al., 2022 ; Syromyatnikov et al. 2022).

A composição da microbiota apresenta também variações na diversidade e na densidade populacional de acordo com as regiões dos intestinos. Isto porque as condições adversas do TGI sofrem drásticas mudanças em termos de fisiologia, pH e tensão de  $O_2$  e motilidade digestiva. Neste contexto, o intestino delgado é um ambiente mais dinâmico e desafiador para as bactérias comensais, principalmente devido ao fluxo intenso e às altas concentrações de sais biliares. Em contrapartida, o

intestino grosso é caracterizado por taxas de fluxo lentas, faixas de pH entre neutro a levemente ácido e baixa tensão de oxigênio. Portanto, observa-se progressivamente um gradiente crescente de espécies estritamente anaeróbias (Rinninella et al. 2019). No entanto, é importante ressaltar que a microbiota intestinal humana é extremamente diversa entre indivíduos, e que ainda há muito a ser descoberto em relação às espécies presentes.

### *1.1.2 Funções e relações simbióticas com o hospedeiro*

A microbiota intestinal possui de dois a 170 milhões de genes únicos, enquanto o genoma humano tem cerca de 25 mil. Dessa forma, o metagenoma microbiano pode representar até 99,9% da informação genética codificante do hospedeiro se considerado como parte do organismo (Almeida et al. 2021). Enquanto o material genético do hospedeiro é herdado verticalmente sendo relativamente estável, o metagenoma é extremamente dinâmico por sofrer alterações rapidamente e se adaptar continuamente às mudanças do ambiente, tais como dieta, ciclos circadianos, infecções, uso de drogas antimicrobianas e estresses (Martino et al. 2022).

Em condições de homeostase, a microbiota mantém uma relação de simbiose com o hospedeiro, trazendo contribuições fundamentais para diversas funções, enquanto ocupam sítios ricos em nutrientes. A maioria das espécies de bactérias que habitam o TGI depende de nutrientes obtidos a partir da dieta, enquanto algumas espécies são capazes de utilizar compostos produzidos pelo próprio hospedeiro como fonte de energia. Estudos sugerem que essa relação mutualística é resultado da coevolução a longo prazo. Portanto, sugere-se que nosso organismo seja não apenas tolerante, mas dependente das funções desempenhadas pela microbiota para que haja um equilíbrio estável e a sobrevivência de ambos (Lerner, Matthias, e Aminov 2017). Entre as funções essenciais desempenhadas pela microbiota intestinal, destacam-se: (i) digestão de fibras resistentes para produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); (ii) comunicação com o Sistema Nervoso Central (SNC) através do eixo intestino-cérebro, influenciando o humor, o comportamento e a cognição; (iii) Proteção contra patógenos, competindo com eles por nutrientes e sítios ou pelo fortalecimento da barreira epitelial; (iv) Regulação do sistema imunológico, pelo estímulo de células e mediadores moleculares da barreira epitelial e de tecidos linfoides associados à camada de mucosas (Ahluwalia, Magnusson, e Öhman 2017).

### *1.1.2.1 Produção de ácidos graxos de cadeia curta na regulação do metabolismo energético do TGI*

A microbiota intestinal digere os componentes dietéticos do hospedeiro para atender às suas próprias necessidades nutricionais, ao mesmo tempo em que fornece energia e nutrientes para o hospedeiro (Chen, Xu, e Chen 2021). Por exemplo, os AGCCs são produzidos pela fermentação de fibras da dieta por bactérias intestinais como *Faecalibacterium* spp. e bifidobactérias. A ligação destes metabólitos com receptores acoplados à proteína G (GPCR) das células do hospedeiro pode afetar funções de metabolismo energético, tais como regulação da sensibilidade à insulina em adipócitos e órgãos periféricos (McNabney e Henagan 2017). Neste contexto, vários tecidos, incluindo tecidos musculares, hepáticos, adiposos e esqueléticos, são conhecidos por possuir estes receptores, cuja ativação leva a alterações fisiológicas benéficas importantes na prevenção de obesidade e diabetes tipo 2. No TGI um dos benefícios amplamente reconhecidos do consumo de fibras é a produção de butirato, propionato e acetato pela microbiota que, por serem moléculas pequenas e altamente hidrofóbicas, podem ser absorvidas rapidamente via difusão simples ou facilitada através da superfície dos enterócitos (Tye et al. 2018).

O butirato tem um importante papel na proliferação e diferenciação das células do epitélio intestinal, sendo responsável por 70% do metabolismo energético no cólon. Além de ser metabolizado como fonte de carbono para as células do intestino grosso, o butirato também ativa receptores do tipo GPCR na superfície celular, incluindo GPR43, GPR41 e GPR109A, que atuam na regulação de vias inflamatórias e também funciona como um inibidor do processo de desacetilação das histonas. Portanto, é capaz de regular a expressão de genes eucarióticos em processos anti-carcinogênicos, principalmente no surgimento de adenocarcinoma (câncer colorretal) através de mecanismos epigenéticos através do remodelamento da cromatina. Ademais, tanto o acetato quanto o propionato têm sido descritos como fatores importantes na lipólise no tecido adiposo, promovendo a inibição do transporte adicional de ácidos graxos livres para o fígado e mantendo a homeostase da glicose no corpo (McNabney e Henagan 2017).

### *1.1.2.3 Comunicação com o eixo intestino-cérebro*

A microbiota intestinal também produz alguns metabólitos neuroativos, como neurotransmissores ou seus precursores, que podem afetar as concentrações de neuromoduladores relacionados ou seus precursores no cérebro (Chen et al. 2021). No

SNC existem neurotransmissores excitatórios produzidos de maneira endógena pelos enterócitos ou células da glia, tais como glutamato, acetilcolina e dopamina, bem como neurotransmissores inibitórios, como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glicina e serotonina, que em geral ativam várias funções cerebrais, incluindo movimento, emoção, aprendizado e memória, mas também sistemas periféricos como certas funções do TGI contribuindo para o equilíbrio homeostático entre a microbiota e o hospedeiro (Gasmi et al. 2023). No entanto, estudos recentes demonstram que algumas bactérias codificam genes para enzimas específicas que podem catalisar a conversão de substratos, principalmente aminoácidos, em neurotransmissores ou precursores correspondentes, que podem atravessar a barreira hematoencefálica. Além disso, alguns metabólitos bacterianos podem atuar indiretamente no SNC, como moléculas sinalizadoras para induzir a síntese e liberação de neurotransmissores por células endócrinas do intestino e pela rápida estimulação do nervo Vago (Chen et al. 2021). Por exemplo, o glutamato, considerado o neurotransmissor mais abundante no cérebro pode ser produzido por espécies comensais como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bacteroides vulgatus* e *Campylobacter jejuni*, a partir de intermediários do metabolismo energético como o oxalacetato. O glutamato pode ainda ser convertido em GABA pela ação da enzima Glutamato-descarboxilase encontrada em bactérias como *Bifidobacterium* spp. *Bacteroides fragilis*, *Parabacteroides* e *Eubacterium* spp. Outros trabalhos sugerem que metabólitos neuroativos derivados de *Staphylococcus*, *Ruminococcus gnavus* e *Clostridium sporogenes* podem ser produzidos a partir de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) (Averina et al. 2020; Otaru et al. 2021). Neste contexto, o indol destaca-se como um dos principais metabólitos produzidos pelo metabolismo do triptofano. Outros metabólitos como o acetato tem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e contribuir para funções no SNC tais como a biossíntese de neurotransmissores (Chen et al. 2021).

#### 1.1.2.3 Interação da microbiota com o Sistema Imune de Mucosas

A barreira de mucosas que reveste o TGI é a primeira interface entre a microbiota presente na luz intestinal e os órgãos e tecidos internos do hospedeiro. Para que haja um equilíbrio homeostático é necessário que as células do hospedeiro sejam capazes de reconhecer antígenos e componentes de origem microbiana a fim de controlar a entrada de toxinas e microrganismos patogênicos oportunistas (Ahluwalia et al. 2017; Manichanh et al. 2012). Neste contexto, o TGI possui

estruturas que atuam tanto em respostas imunes inatas quanto adaptativas, permitindo a tolerância de comensais benéficos e ao mesmo tempo impede a invasão de parasitas (Boulangé et al. 2016).

Entre estas estruturas do componente inato destacam-se as células especializadas do tecido epitelial, tais como as células caliciformes, responsáveis pela formação da camada de muco, que além de servir de sítio aderente, também fornece nutrientes para bactérias comensais tais como *Akkermansia muciniphila*, *B. bifidum* e *B. thetaiotaomicron* (Liu et al. 2022). Estudos revelam que espécies de bactérias com atividades mucolíticas são capazes de assimilar nutrientes da camada de muco através de enzimas que quebram os oligossacarídeos, presentes nas proteínas denominadas mucinas, em açúcares simples. As mucinas, principalmente a MUC2, são moléculas abundantes, compostas por uma cadeia de carboidratos (oligossacarídeos) ligados a uma cadeia proteica (Kim et al. [s.d.]). *A. muciniphila* possui uma série de enzimas, incluindo sialidases, glicosidases e sulfatases, que podem quebrar os oligossacarídeos presentes na mucina em monossacarídeos e AGCC como o acetato, que podem ser usados como fonte de energia pela microbiota intestinal e possuem atividade anti-inflamatória através da ligação de receptores GPCR nas células intestinais, como GPR41 e GPR43 que atuam na inibição do fator NF- $\kappa$ B (do Inglês - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) na produção de citocinas pró-inflamatórias (Li et al. 2021; Liu et al. 2021).

Outras vias de comunicação entre as células epiteliais e as bactérias comensais ocorre pela interação de ligantes de origem microbiana conhecidos como padrões moleculares associados aos microrganismos (MAMP – do Inglês - *Microbe Associated Molecular Patterns*) e receptores expressos na superfície celular eucariótica, denominados receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Os MAMP estão presentes em diversas sub-localizações celulares das bactérias, incluindo lipoproteínas, ácidos nucleicos (moléculas de RNA e DNA não metiladas) peptídeo-glicanos e ácidos lipotéicos presentes na parede celular de bactérias Gram-positivas, lipopolissacarídeos (LPS) (bactérias Gram-negativas) e flagelinas (Boulangé et al. 2016; Manichanh et al. 2012).

Os RRP mais estudados são os receptores do tipo Toll (TLRs - do Inglês - Toll-like receptors), e do tipo NOD (NLR- do Inglês - *Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors*) normalmente são encontrados como proteínas associadas as membranas celulares ou peptídeos sensoriais citoplasmáticos

que participam da e transdução de sinais e da cascata de sinalização envolvidos em diversos mecanismos protetores que incluem o fortalecimento da barreira epitelial, através da expressão de proteínas envolvidas nas junções firmes dos enterócitos, tais como ocludinas e zonulinas, secreção de peptídeos antimicrobianos como as defensinas, e na produção de muco (de Zoete e Flavell 2013). Porém em condições de homeostasia a ativação de respostas imunes inflamatórias não ocorrem no TGI, uma vez que a inflamação pode comprometer a função de barreira da camada de mucosas. Existem estruturas imunológicas acopladas à mucosa intestinal, como por exemplo o tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT – do Inglês - Gut-Associated Lymphoid Tissue) difusamente distribuído ou na forma de Placas de Peyer, nos quais acontece indução de respostas imunes adaptativas (antígeno específica) efetoras, ou seja envolvidas na proteção contra de patógenos e na tolerância imunológica aos comensais (Carvalho et al. 2017; Kobayashi et al. 2019). Estas estruturas coletam antígenos trazidos capturados do intestino para os apresentarem através das células apresentadoras de antígenos aos linfócitos, estimulando respostas imunes adaptativas do tipo Th1, Th2, Th17 ou Treg. A ativação do tipo de resposta linfocitária reguladora ou efetora depende de fatores como citocinas produzidos pelas células do epitélio mucoso e de estímulos de compostos microbianos tais como MAMP (Boulangé et al. 2016). Dessa maneira, os enterócitos juntamente com as células do sistema imune participam da iniciação e regulação da imunidade dirigida aos microrganismos comensais. Neste contexto, as células Treg suprimem as respostas efetoras principalmente pela produção de Interleucina (IL)-10 e TGF- $\beta$  impedindo o recrutamento de granulócitos, e a ativação de macrófagos, neutrófilos ou passo que também são capazes de estimularem a produção da Imunoglobulina A, considerada um dos principais mecanismos protetores do TGI. Estima-se que diversas espécies da microbiota intestinal, incluindo o gênero *Lactobacillus*, são capazes de estimular respostas anti-inflamatórias pela estimulação de IL-10 via ativação por receptores TLR ou NOD (Kobayashi et al. 2019; Reboldi e Cyster 2016). Dessa forma o GALT é continuamente desafiado por antígenos microbianos mesmo em condições saudáveis, gerando uma resposta tolerogênica aos microrganismos benéficos, que compõe a maior parte da microbiota intestinal. Contudo, a homeostase do TGI pode ser comprometida pelo aumento no estímulo da resposta efetora, causado por alterações da comunidade microbiana, tais como



expansão de espécies potencialmente patogênicas, levando ao aparecimento de condições inflamatórias (Carvalho et al. 2017).

## 1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais

As Doenças Inflamatórias Intestinais (IBD – do Inglês – *Inflammatory Bowel Diseases*) são um grupo de doenças crônicas idiopáticas, ou seja, com etiologia exata desconhecida. Porém, estudos revelam que a interseção de diversos fatores como dietas ricas em carboidratos e gordura, hábitos de higiene, tabagismo e estresse, susceptibilidade genética e alterações da microbiota levam à uma resposta inflamatória exacerbada na mucosa do TGI. As IBD possuem duas formas clínicas principais, a saber a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa. Ambas são caracterizadas por dores intensas na região do abdômen, diarreia, sangramento e perda de peso. Os pacientes que desenvolvem estas doenças são geralmente acometidos por períodos cíclicos de recorrência e interrupção da inflamação que pode durar várias semanas. A incidência das IBD tem aumentado mundialmente nos últimos anos devido ao estilo de vida ocidental caracterizado por dietas pobres em fibras de origem vegetal, uso inadequado de antibióticos, principalmente na infância quando a microbiota ainda é instável (Ananthakrishnan 2015; Carvalho et al. 2017).

### 1.2.1 Disbiose associada as IBD

Apesar de diversos fatores influenciarem o estabelecimento das IBD, as alterações da estrutura e funções da microbiota tem sido frequentemente apontada pela comunidade científica como tendo um papel chave no processo patogênico. Isto porque o microbioma de pacientes de Doença de Crohn e Colite Ulcerativa apresentam uma queda nas populações de espécies de bactérias responsáveis pela produção de AGCC envolvidos na manutenção do epitélio intestinal e pela estimulação dos mecanismos de tolerância, podendo destacar os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Verrucomicrobia tais como *Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp. e *Akkermansia muciniphila* (Manichanh et al. 2012). Em contrapartida, pode ser encontrado um aumento de espécies consideradas potencialmente patogênicas como *Clostridium difficile*, *Ruminococcus gnavus* e diversos gêneros do filo Proteobacteria. Este estado caracterizado pela

composição anormal da microbiota denomina-se disbiose, e leva a ativação dos RRP das células epiteliais, estimulando respostas imunes com perfil pró- inflamatório mediado principalmente por citocinas tais como TNF, IL-6, IFN- $\gamma$  IL-12 e IL-17 (Manichanh et al. 2012; de Zoete e Flavell 2013).

Estudos recentes têm discutido o papel de respostas imunes induzidas pela ativação do inflamassoma via receptores NLR. Até o momento, sabe-se que membros de três famílias de receptores de reconhecimento de padrão têm um papel estabelecido na montagem do inflamassoma: NLRP1, NLRP3, NLRC4 e proteínas inibidoras de apoptose neuronal (NAIPs) da família de receptores semelhantes a NOD (NLR) (Tye et al. 2018). O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico envolvido na ativação da resposta inflamatória do corpo. No TGI ele é expresso tanto em células do sistema imunológico, incluindo células imunes residentes no intestino, como macrófagos, quanto em células dendríticas e células epiteliais intestinais. Sua ativação ocorre quando os receptores NLRP3 detectam a presença de sinais do ambiente, como, infecções, estresse celular, danos teciduais ou produtos bacterianos como os MAMP, que leva à produção e liberação de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-18. Na Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa, o inflamassoma NLRP3 está hiperativo e leva à produção excessiva de citocinas inflamatórias, o que pode provocar danos na mucosa intestinal (Huang, Xu, e Zhou 2021).

Estudos *in vivo* em modelo murino de colite induzida por sulfato de sódio Dextrano (DSS) demonstram que a ativação do inflamassoma em camundongos também causa perda de neurônios entéricos reduzindo a motilidade intestinal. Os neurônios entéricos são células nervosas que regulam a motilidade e a função do TGI. Eles são altamente sensíveis às citocinas inflamatórias e podem ser danificados pela inflamação. A perda de neurônios entéricos pode resultar em uma variedade de distúrbios gastrointestinais, como constipação, diarreia, dispepsia e dor abdominal (Magalhães e Castelucci 2021).

Por outro lado, a deficiência na ativação do inflamassoma NLRP3 também pode contribuir para a inflamação intestinal, uma vez que a supressão da resposta inflamatória pode permitir a proliferação de bactérias patogênicas e aumentar a suscetibilidade a infecções. Em resumo, a ativação do inflamassoma NLRP3 desempenha um papel importante na inflamação intestinal, e o seu papel

específico pode variar dependendo do contexto fisiológico e patológico (Zaki et al. 2010).

### *1.2.2 Intervenções terapêuticas das IBD*

As IBD ainda não têm cura definitiva, mas existem diversos tipos de tratamento que atuam no controle dos sintomas, prevenção de complicações como infecções e na melhora da qualidade de vida dos pacientes. O uso de drogas imunossupressoras mais utilizados são os corticoides e os aminossalicilatos, Por ser derivado do cortisol que também está envolvido em várias funções metabólicas, além da regulação do sistema imune, o uso prolongado leva a efeitos colaterais que incluem alterações de humor, hiperglicemia, dores de cabeça e osteoporose (Cai, Wang, e Li 2021). Adicionalmente, podem comprometer o sistema imunológico tornando o indivíduo mais susceptível a infecções portanto requer um acompanhamento médico frequente. Os aminossalicilatos têm sido bastante utilizados no tratamento das IBD, porém agem através da inibição de alvos específicos tais como moléculas de adesão dos leucócitos impedindo seu recrutamento para a mucosa intestinal. O uso de aminossalicilatos também está associado a diversos efeitos colaterais que reduzem o bem-estar do paciente, incluindo desconforto abdominal, anemia, infertilidade e a deficiência de ácido fólico (Greenfield et al. 1993). O uso de anticorpos monoclonais que se ligam a moléculas específicas envolvidas na inflamação intestinal, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ou a integrina  $\alpha 4\beta 7$  ajudam a reduzir a inflamação e prevenir as recidivas das IBD. Os antibióticos de amplo espectro, podendo destacar Metronidazol e a Ciprofloxacina, são utilizados para prevenir complicações graves, porém seu uso pode comprometer a estrutura da comunidade microbiana e induzir a resistência antimicrobiana em bactérias com potencial patogênico. Procedimentos cirúrgicos vezes são também utilizados em casos mais graves para a remoção do cólon e do reto em pacientes de Colite Ulcerativa, enquanto na Doença de Crohn emprega-se a remoção de segmentos danificados (Moreno, Fernández-Tomé, e Abalo 2021).

Portanto, considerando que o tratamento convencional para as IBD não proporciona um efeito terapêutico satisfatório e pode causar sérios efeitos colaterais aos pacientes, é imprescindível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam fornecer resultados mais eficazes e duradouros.

### 1.3 Alimentos funcionais

Uma vez que a dieta de estilo ocidental é um fator significativo no desenvolvimento de IBD, estratégias nutricionais, incluindo o consumo de alimentos funcionais, têm sido consideradas como uma alternativa para a sua prevenção. Alimentos funcionais são aqueles que, além de fornecer nutrientes básicos para o corpo, contêm compostos bioativos que podem ter benefícios adicionais à saúde. Esses compostos podem incluir vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos ômega-3, fitoquímicos, probióticos, prebióticos e outros componentes que podem ajudar a prevenir ou tratar doenças e melhorar a saúde (Ananthakrishnan 2015; Shin e Lim 2020).

Prebióticos são compostos alimentares não digeríveis que, quando consumidos em quantidades adequadas, promovem o crescimento e a atividade de bactérias benéficas no intestino. Esses compostos alimentares resistem à digestão e são capazes de chegar ao cólon intactos, onde são fermentados pela microbiota intestinal. Como resultado da fermentação, essas bactérias produzem metabólitos secundários, como os AGCC, que são importantes para a saúde intestinal e geral. Os prebióticos podem ser encontrados em alimentos de origem vegetal como frutas, legumes, grãos integrais e de origem animal como o leite e derivados (Davani-Davari et al. 2019).

Probióticos são microrganismos vivos, principalmente bactérias e leveduras, que quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Muitos destes microrganismos possuem características fenotípicas semelhantes às espécies de comensais encontradas naturalmente no TGI, e quando consumidos em quantidades adequadas, podem contribuir para algumas funções da microbiota tais como a digestão e a absorção de nutrientes, fortalecimento do sistema imunológico e inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Os probióticos podem ser encontrados em diversos alimentos fermentados, como iogurtes, kefir, kombucha e chucrute, bem como na superfície de plantas, e em cavidades de outros animais. É importante notar que diferentes cepas de probióticos podem ter diferentes efeitos sobre a saúde, e a quantidade e frequência de consumo também podem influenciar os efeitos protetores (Carvalho et al. 2017).

### 1.3.1 Uso de produtos lácteos fermentados no tratamento das IBD

Os compostos bioativos presentes no leite e produtos lácteos são cruciais para muitos processos bioquímicos e fisiológicos, tornando-os uma parte importante de uma dieta saudável. O consumo de alimentos funcionais lácteos fermentados em quantidades adequadas pode trazer benefícios à saúde, uma vez que esses alimentos fornecem nutrientes essenciais, como vitaminas e minerais, além de terem efeitos positivos em uma ou mais funções biológicas com propriedades anti-inflamatórias. Ademais, os produtos lácteos fermentados são particularmente adequados para transportar bactérias probióticas ao intestino humano e proporcionar o ambiente propício ao seu crescimento. Pesquisas anteriores indicam que as bactérias utilizadas na fermentação de produtos lácteos como queijos e iogurtes têm a capacidade de hidrolisar a caseína, que é a proteína mais comum do leite. Esse processo pode produzir glicomacropéptidos bioativos (GMP) que contêm cadeias de carboidratos que podem servir como substratos importantes para as bactérias autóctones do TGI (Chatterton et al. 2013; Sawin et al. 2015). Os GMP derivados do leite têm sido estudados por seus efeitos anti-inflamatórios no tratamento da inflamação intestinal. Vários estudos indicam que os GMP são capazes de modular a resposta imune, em modelos animais de colite. Um mecanismo proposto para o efeito anti-inflamatório dos GMP é sua capacidade de se ligar a receptores específicos presentes em células do sistema imunológico, como os receptores TLR. Essa interação pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Feeney et al. 2017; Pruss et al. 2021). Adicionalmente, a inclusão de cepas probióticas bacterianas em alimentos lácteos pode conferir propriedades protetoras adicionais. Neste contexto, com o intuito de avaliar esta estratégia como alternativa para o tratamento de IBD, nosso grupo de pesquisa desenvolveu dois queijos do tipo Suíço experimentais. No primeiro do tipo, foi utilizada a cepa com potencial probiótico *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129; enquanto no segundo, do tipo Emmental, três cepas - *P. freudenreichii*, e mais duas bactérias lácticas com propriedades anti-inflamatórias, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 e *Streptococcus thermophilus* LMD-9 (Rabah et al. 2020).

Esta cepa de *P. freudenreichii* é capaz de produzir vitaminas do complexo B, incluindo a vitamina B12, que é importante para a saúde do sistema nervoso,

efeito imunomodulador estimulando a produção de anticorpos IgA, em modelo animal de mucosite intestinal, inibição de bactérias patogênicas e regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios, reduzindo sua absorção pelo organismo. Estudos *in vitro* sugerem potencial anticancerígeno, inibindo o crescimento de células tumorais. Além disso as propionibactérias são essenciais para o preparo do queijo tipo Emmental, sendo responsável pelo processo de maturação e propriedades organolépticas o que torna *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 uma cepa ideal para o desenvolvimento de alimentos funcionais e para o tratamento da colite (Aburjaile et al. 2016; Rabah, Rosa do Carmo, e Jan 2017). Adicionalmente as cepas de *L. delbrueckii* CNRZ327 e *S. thermophilus* LMD-9 apresentaram propriedades anti-inflamatórias em estudos realizados em modelos animais e *in vitro*, entre as quais destacam-se a redução da produção de citocinas pró- inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , ação antioxidante, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio que contribuem para o estresse oxidativo e a inflamação, proteção da barreira intestinal, prevenindo a entrada de patógenos e toxinas na corrente sanguínea (El Kafsi et al. 2014; Junjua et al. 2016; Santos Rocha et al. 2014).

Os resultados do nosso estudo anterior utilizando um modelo de colite murina induzida por DSS, mostraram que o queijo Emmental teve um efeito protetor devido à sinergia entre as bactérias do ácido lático e *P. freudenreichii* (Rabah et al. 2020). Esses achados sugerem que estudos clínicos em pacientes com colite ulcerativa podem ser promissores. Contudo, uma vez que a microbiota tem sido apontada como tendo um papel chave nas funções do TGI, outros estudos devem ser feitos para avaliar o impacto dos queijos experimentais na microbiota intestinal, incluindo a modulação de outras bactérias simbióticas, podendo destacar *Akkermansia*, *Lactobacillus*, *Roseburia* e *Faecalibacterium*. Por outro lado, a modulação de bactérias patogênicas também merece atenção, pois algumas podem contribuir para a inflamação na colite, afetando a estrutura e função da microbiota intestinal e a eficácia do tratamento com os queijos experimentais.

#### **1.4 Uso da metagenômica na investigação de microbiomas**

Por muitos anos, os cientistas têm se interessado pela microbiota intestinal, mas um dos principais desafios na pesquisa relacionada tem sido a dificuldade em cultivar esses microrganismos. Inicialmente, a investigação da composição da microbiota intestinal em seres humanos era conduzida por meio de observações microscópicas e cultivo de bactérias a partir de amostras fecais ou biópsias intestinais. Contudo, a abordagem microbiológica clássica tem uma limitação, uma vez que 70-80% das espécies de bactérias presentes no TGI não podem ser cultivadas em meios artificiais (Almeida et al. 2021). Nesse cenário, as técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento do gene da subunidade 16S do rRNA e o sequenciamento metagenômico completo por meio de plataformas de nova geração (NGS – do Inglês – *Next Generation Sequencing*), têm impulsionado significativamente a investigação dos microbiomas (Carvalho et al. 2017). Nos últimos anos, diversos programas de pesquisa em consórcios internacionais, como o MetaHIT (do Inglês – *Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) e o HMP (do Inglês – *Human Microbiome Project*), têm se empenhado em caracterizar a microbiota que está associada ao trato gastrointestinal humano por meio do sequenciamento genômico de espécies individuais e amostras de comunidades microbiológicas complexas. Esses esforços têm possibilitado uma descrição mais detalhada da composição da microbiota intestinal e de suas funções relacionadas ao TGI (Dusko Ehrlich e MetaHIT consortium 2010; Qin et al. 2010). Com a redução do custo do sequenciamento, as abordagens metagenômicas são agora comumente usadas por vários grupos de pesquisa em diferentes países para estudar comunidades microbianas com mais detalhes. Pesquisas baseadas no uso de tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho tem produzido rapidamente grandes quantidades de informação genética, disponibilizando milhares de genomas microbianos em base de dados públicas como o NCBI (do Inglês - *National Center for Biotechnology Information*). Essas sequências genômicas fornecem um catálogo abrangente dos componentes genéticos microbianos que podem ser utilizado para compreender a fisiologia microbiana de diversos habitats, tal como o TGI humano (Segal et al. 2019).

Com o dilúvio de informações geradas, tem sido indispensável o uso de técnicas de bioinformática para a análise de dados metagenômicos. A maior parte das pesquisas relacionadas ao estudo do microbioma do TGI, tem empregado o uso da metataxonômica por apresentar custos reduzidos e meios rápidos de definir a comunidade microbiana, através do sequenciamento do gene 16S rRNA, que estão presentes em todos os organismos celulares (Carvalho et al. 2017; Dusko Ehrlich e MetaHIT consortium 2010). Por ser

relativamente pequeno e apresentar um nível altamente significativo de conservação de sequência de bases nucleotídicas entre espécies bacterianas, mas que apresenta variações suficientes para inferir relações evolutivas, este gene tem sido considerado o melhor marcador taxonômico universal para estudo de bactérias e arqueias. A metataxonômica, também cunhada como Metagenômica subtrativa ou direcionada, procura amplificar e subsequentemente sequenciar as regiões hiper variáveis do gene codificante de 16S rRNA e posteriormente as sequências únicas ou agrupadas representando unidades taxonômicas operacionais (OTU – do Inglês – *Operational Taxonomic Units*) são identificadas em filotipos de acordo com a sua similaridade com sequências anotadas em um banco de dados de referência. Apesar de ser uma ferramenta poderosa, ela apresenta algumas limitações, incluindo resolução apenas até o nível de gênero, o que impede a distinção entre espécies filogeneticamente próximas. As etapas de amplificação podem introduzir vieses como “quimeras” artificiais, resultando em uma falsa impressão da diversidade microbiana. Além disso, a detecção por este tipo de abordagem é limitada a alvos específicos e não permite identificar de maneira compreensiva outras regiões genômicas, o que a torna ineficaz para o estudo de função dos microbiomas (Hilton et al. 2016; Pérez-Losada et al. 2022).

Em contrapartida, a abordagem de metagenômica de *shotgun*, é capaz de realizar o sequenciamento não direcionado de DNA do conteúdo gênico de toda a comunidade em um ambiente, e permite fornecer identificação taxonômica de alta resolução permitindo distinguir diferentes cepas de uma mesma espécie, assim como prever funções da comunidade microbiana. Isto porque, diferente da abordagem metataxonômica, que tem como alvo apenas cópias de fragmentos de DNA de um único marcador, todas as moléculas de DNA extraído de uma determinada amostra são fragmentadas em partes menores e sequenciadas de maneira independente (Segal et al. 2019). As sequências de DNA resultantes podem ser montadas visando à reconstrução dos genomas das espécies de um determinado microbioma, e posteriormente alinhados contra um banco de dados primários ou especializados para fornecer dados taxonômicos quantitativos precisos e anotação funcional de genes. Além disso a predição das vias metabólicas em escala comunitária também pode ser obtida pela abordagem de metagenoma completo através de pesquisas de similaridade de sequência em bancos de dados de vias biológicas, e usaros resultados obtidos para anotar genes e reconstruir vias metabólicas (Abubucker et al. 2012; Frioux et al. 2020).



Considerando que a interação complexa entre produtos da fermentação das cepas probióticas de *P. freudenheichi*, *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* liberadas na composição do queijo e a microbiota intestinal pode determinar o papel benéfico do uso do queijo tipo Suíço no tratamento da inflamação intestinal, o objetivo do presente estudo é investigar como os queijos funcionais experimentais afetam a microbiota intestinal em camundongos C57BL6, em condições de homeostase e inflamação induzida por DSS utilizando uma abordagem de sequenciamento metagenômico completo.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de queijos funcionais experimentais na estrutura e função a microbiota intestinal em condições de homeostase e inflamação.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do consumo dos queijos na estrutura e função do microbioma intestinal de camundongos C57BL6 na condição de homeostase;
- Avaliar os efeitos do consumo dos queijos na estrutura e função do microbioma em modelo animal de colite induzida por DSS em camundongos C57BL6.

### **3. Capítulo I**

Este capítulo contém um artigo de pesquisa original conduzido pelo grupo do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da UFMG em colaboração com o Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) de Rennes, na França. O artigo foi submetido na revista BMC Microbiome, e teve como objetivo investigar os efeitos de queijos tipo Suíço funcionais na microbiota intestinal de camundongos na condição de saúde ou inflamatória, utilizando a abordagem de sequenciamento metagenômico completo, na busca por compreender mecanismos associados às propriedades benéficas ou fatores de risco associados ao uso dos queijos experimentais como uma possível alternativa para o tratamento de IBD.

**Functional Swiss-type experimental cheeses diet promotes beneficial effects in mice gut microbiome during homeostasis and inflammation**

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho<sup>1,2</sup>, Houem Rabah<sup>3</sup>, JuanCarlos Ariute<sup>4</sup>, Flávia Figueira Aburjaile<sup>4</sup>, Bertram Brenig<sup>5</sup>, Eric Guédon<sup>3</sup>, Yves Le Loir<sup>3</sup>, Gwénaél Jan<sup>3</sup> and Vasco Azevedo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biofísica, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

<sup>3</sup> STLO, INRAE, Institut Agro, Rennes, France

<sup>4</sup> Laboratory of Integrative Bioinformatics, Preventive Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup> Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Göttingen, Germany

\* Correspondence:

Dr. Vasco Azevedo

vascoariston@gmail.com

Av. Antonio Carlos, 6627. Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CP 486  
CEP 31270-901

## Abstract

### Background

Nutritional interventions have been considered an alternative rationale for preventing Inflammatory Bowel Diseases. The investigation of their impact on the gut microbiota is a fundamental question since shifts in the composition of the commensal bacterial community are required for the onset and maintenance of colitis. Therefore, in this study, we investigated the effects of two types of cheeses, fermented by probiotic propionibacteria. One experimental single-strain cheese was solely fermented by *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA129. Another was an Emmental made in industrial conditions using the same propionic strain, in combination with *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 and *Streptococcus thermophilus* LMD-9, as starters. Both kinds of cheese were tested in healthy conditions and the context of DSS-induced colitis in conventional C57BL6 mice and the gut microbiota was investigated.

### Results

Based on the metagenomic analysis, our results suggest that the consumption of both cheese types tested did not disturb the typical microbial community, although the Emmental intake increased symbionts population as *Romboutsia* sp. and partially increased *Akkermansia muciniphila*. Furthermore, metabolic pathway reconstruction analysis suggests that *A. muciniphila* may produce acetate through sulfate assimilatory metabolism and may cooperate with other commensal species in tryptophan and glutamate metabolism to produce indole and gamma-aminobutyric acid. Considering the colitis context, the consumption of the single-strain cheese restored some of the impaired microbiome metabolic functions, while Emmental cheese promoted the increase of *Ligilactobacillus murinus*. This bacterium presented several genes involved in producing metabolites and adhesin proteins with potential immunomodulatory activity.

### Conclusions

This study concludes that the Emmental cheese effects increased the microbiota's capacity to produce metabolites involved in gut-brain axis regulation in intestinal homeostasis condition and, therefore, may represent a potential therapy for inflammatory neurodegenerative diseases. Regarding the colitis context, our results support the beneficial properties of functional Emmental cheese by suggesting possible anti-inflammatory mechanisms based on the promotion of *Lg. murinus* interaction with the host.

**Keywords:** Functional Cheese, Probiotics, Shotgun Metagenomics, OMICS, Inflammatory Bowel Diseases, Gut Microbiota

## Background

Western lifestyle, including diet, plays an important role in the growing prevalence of Inflammatory Bowel Disease (IBD), a set of chronic diseases for which no cure exists. Conventional IBD treatment promotes strong side effects, responsible for a negative impact on patients' well-being [1]. Therefore, nutritional interventions such as the use of functional foods have been glimpsed as a way to alleviate IBD symptoms [2]. Dairy products, including beverages and cheeses, are interesting candidates for developing novel rationales for treating gut inflammation, as they contain antioxidation and anti-inflammatory bioactive molecules such as vitamins, minerals, fatty acids, and peptides produced by the bacterial fermentation process [3].

Moreover, using probiotic bacterial strains in food may provide additional protective properties. In this context, two Swiss-type experimental cheeses were developed by our research group in an attempt to evaluate their protective capacity in a murine colitis model induced by Dextran Sodium Sulphate (DSS) [4]; One using the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA129 strain as a unique starter (Single-strain cheese); and a second cheese (Emmental-type cheese) based on the use of three strains, *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 and two Lactic Acid Bacteria (LAB), *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 and *Streptococcus thermophilus* LMD-9. These three strains were selected based on their ability to protect the integrity of the intestinal mucosal barrier, even when challenged by acute inflammation [5]. Although this approach has been demonstrated to ameliorate symptoms of inflammation, the impact of the experimental cheeses on the gut microbiota remains veiled.

Indeed, the composition of the diet is known to modulate the gut microbiome rapidly and reproducibly [6]. Accordingly, dairy products may modulate gut microbiota and immune response [7]. In addition to high amounts of bacteria involved in ripening, cheese may contain prebiotic factors leading to a modification of the composition of the bacterial community in the gut, which could be either beneficial or detrimental to the host's health. Recent studies suggest our microbiome can dynamically respond to environmental changes, such as diet, via a restructuration of microbial species populations, either by selecting adaptation mechanisms or driven by horizontal gene exchange from allochthonous food-borne bacteria [8]. In addition, it is well established that substantial changes in the microbiota are involved in the pathogenesis of IBD and metabolic syndromes such as obesity [9]. On the other hand, the use of functional foods with live microorganisms has been shown to improve symbiotic functions by increasing the microbiota metabolic processes involved in the production of short-chain fatty acids (SCFA) and other beneficial metabolites with protective roles in the gut and may also affect in a positive way systemic physiology [2], [10].

Given interesting results on the restoration of colitis in mice with the cheese, including down-regulation of the proinflammatory markers Tumor Necrosis Factor (TNF) and Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), in the present study, we aimed to investigate the modulatory effects of the experimental cheeses towards the gut microbiota, in homeostasis condition and during inflammation induced by DSS, in the C57BL6 mice model, using high standard Shotgun metagenomic sequencing approach.

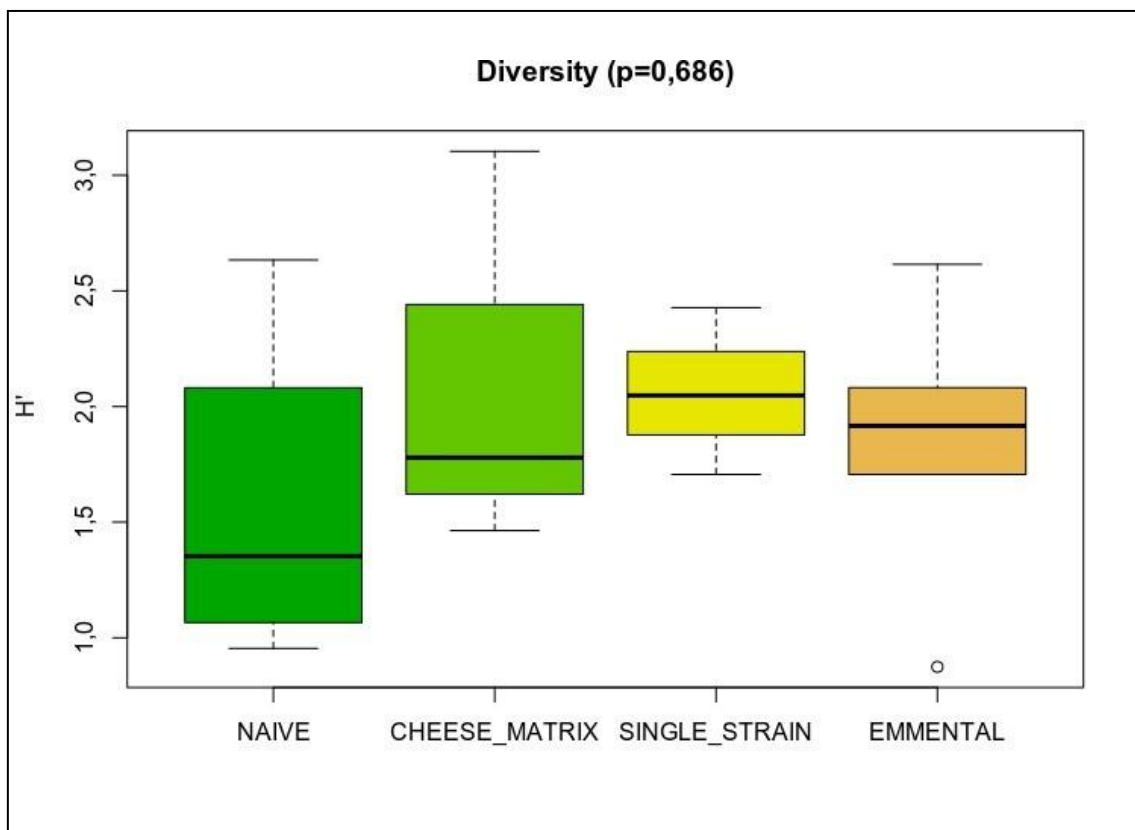
## Results

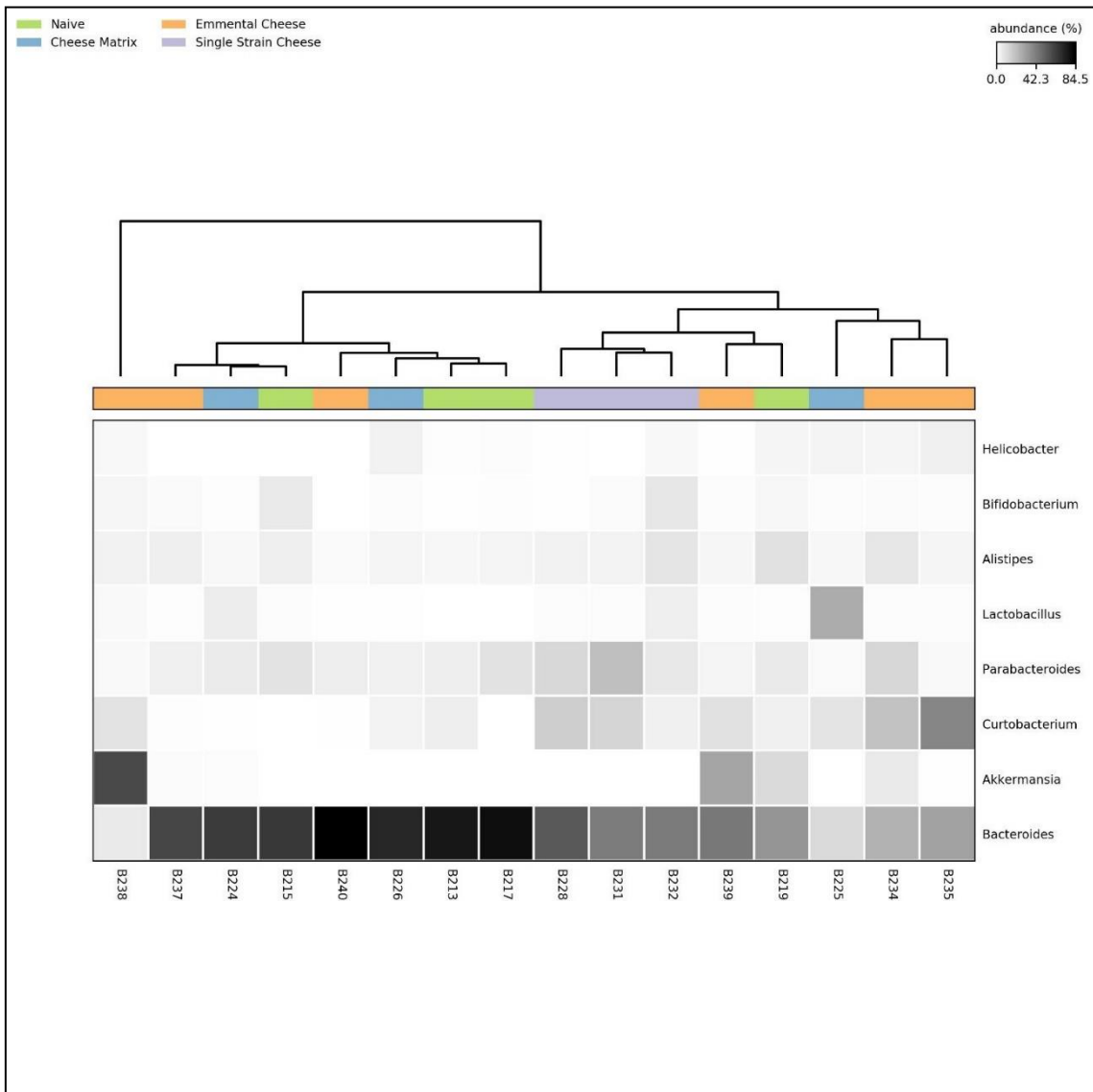
### Effects of cheese consumption on microbiome structure and function in homeostasis:

#### Treatment with both kinds of cheese does not disturb microbiome diversity, but Emmental increases the population of *Romboutsia* and *Akkermansia* in healthy conditions

Shannon index analysis revealed no difference ( $p=0,686$ ) among the groups of healthy mice, as shown in Figure 1A, suggesting that the treatment with the two kinds of cheese does not affect the gut microbiota diversity. Regarding the analysis of the relative abundance of taxa (Figure 1B and Table S1), the five most abundant genera in the controlgroup (Naïve) were *Bacteroides* (64,3%), *Parabacteroides* (8,0%), *Alistipes* (5,5%), *Akkermansia* (3,2%) and *Bifidobacterium* (2,8%). None of those genera populations presented significant changes after consumption of the cheeses. However, *Romboutsia* showed a significant increase in mice consuming the Emmental cheese (0,2%), when compared to the Naïve group (0,02%) ( $p=0,029$ ). Although *Akkermansia* did not show a statistically significant difference, it was found enriched (20-60%) in three samples ( $n=6$ ) of the Emmental Cheese feeding group.

A



**B**

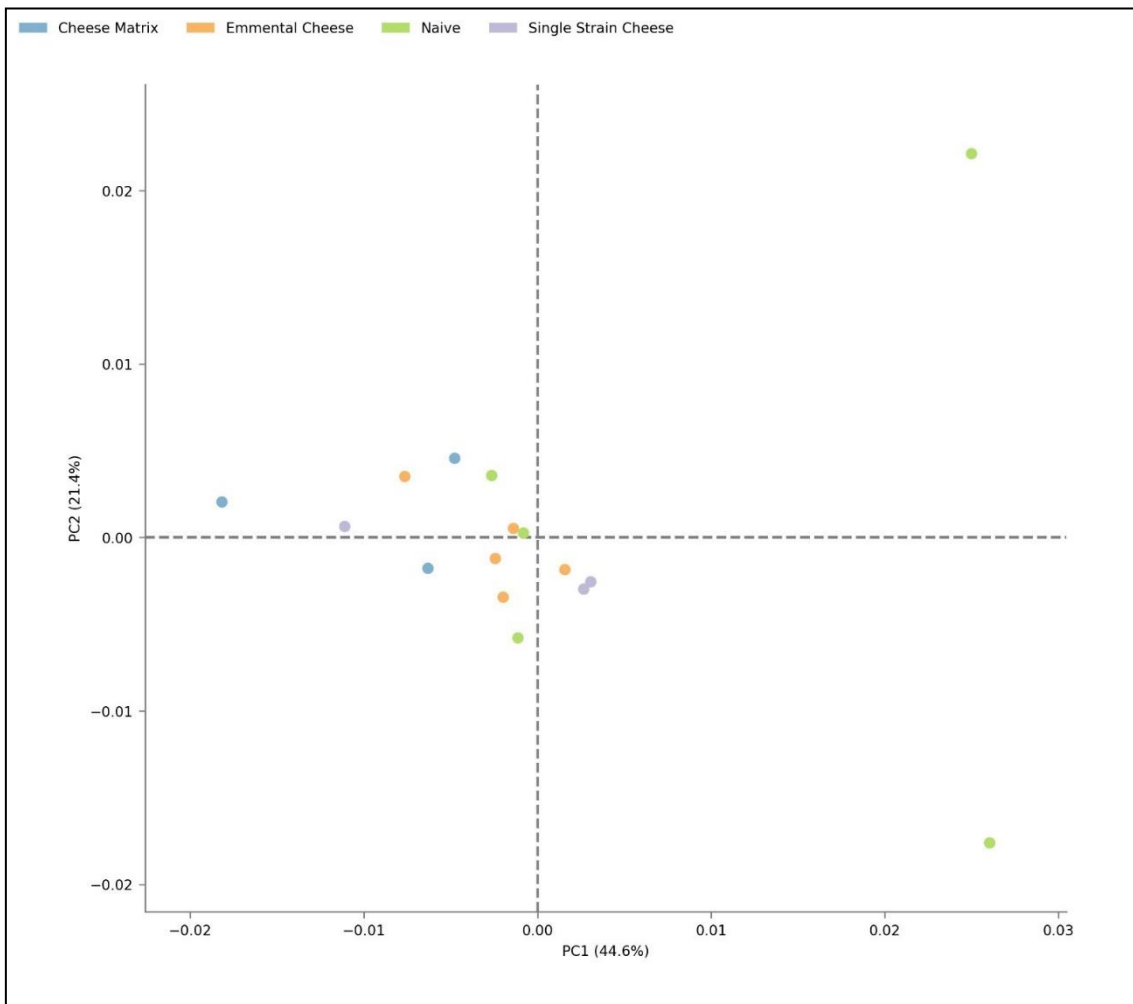
**Figure 1. Microbiome taxonomy profile in healthy mice treated with cheeses.** Beta-diversity analysis based on Shannon index ( $H'$ ) in (A). The line inside the box plot represents the median of  $H'$ . The length of the whiskers represents 1,5 times the inter- quartile range ( $H' \pm IQR \times 1.5$ ). The white circle in the graph represents outliers ( $>1,5 \times IQR$ ). One-way ANOVA followed by Tukey Pos hoc test. No statistical significance, P-value  $> 0.05$ . Heatmap of bacterial taxonomy relative abundance in (B). Data in the graph represent the proportion of reads assigned to a given genus-level taxon. Dendrogram represents a hierarchical clustering based on the UPGMA method.

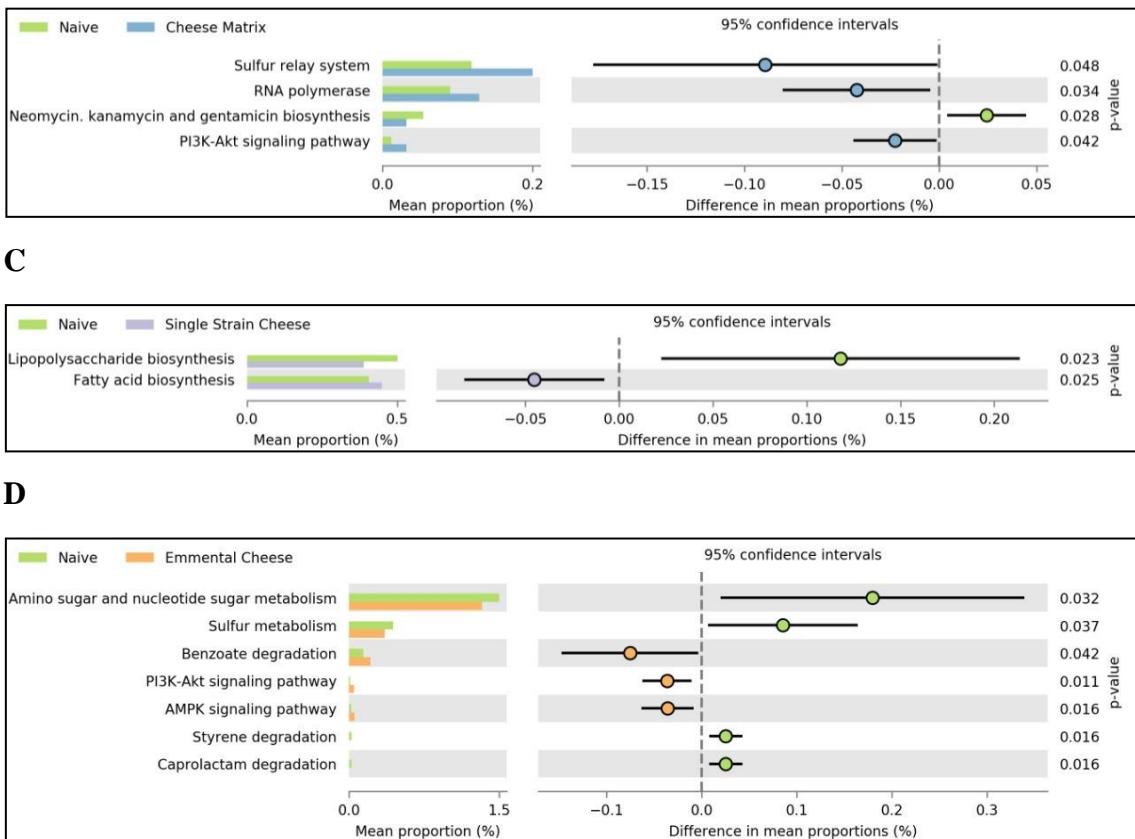
**Treatment with cheeses modulates metabolic and cellular processes involved in microbiota adaptation to environmental stress, sulfur assimilation, and xenobiotics in healthy conditions**



The principal component analysis (PCA) of the number of genes in each KEGG pathway category indicates high data homogeneity among healthy mice groups, as shown in Figure 2A. The analysis of similarities (ANOSIM) indicated no significant difference among the groups (Figure S1) ( $P = 0,1824$ ). Regarding the functional profiling comparison among the groups (Figure 2B, C, D, and E and Table S2), the cheese matrix consumption promoted an enrichment of genes involved in the sulfur relay system, RNA polymerase functions, and PI3K-Akt signaling pathway. At the same time, a reduction was observed in neomycin, kanamycin, and gentamicin biosynthesis when compared to the Naïve group. Mice fed on the single-strain cheese exhibited a decrease in lipopolysaccharide biosynthesis (LPS) and an increase in fatty acids biosynthesis. After treatment with Emmental-type cheese, mice microbiota mainly presented a decrease in gene richness associated with amino sugar and nucleotide sugar metabolism, and sulfur metabolism. However, an increase in benzoate degradation and two kinase signaling pathways was also observed when compared to the Naïve group.

**A**





**Figure 2. Microbiome functional profile in healthy mice treated with cheeses.** Principal component analysis (PCA) plot of the number of genes per KEGG pathway in (A). Extended error bar plot showing the differentially enriched pathways between the following groups: Naïve and Cheese matrix in (B); Naïve and Single-strain cheese in (C), and Naïve and Emmental-type cheese in (D). Welch's test. Statistical significance when P-value < 0.05.

### Effects of cheese consumption on microbiome structure and function in mice with colitis:

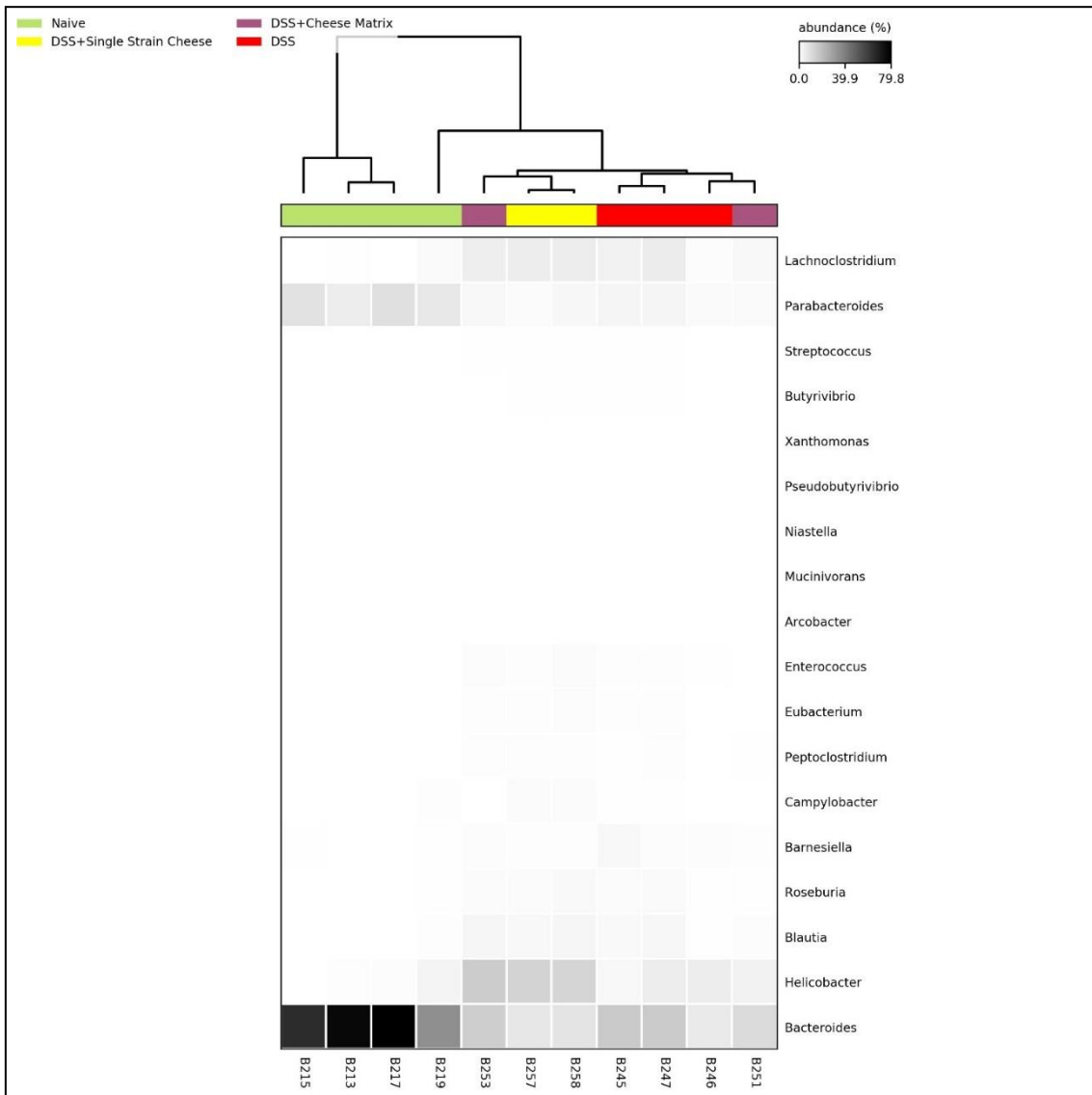
#### Microbiota of mice fed with single-strain cheese increases in Proteobacteria during inflammation

The beta diversity analysis indicated no significant difference among the groups ( $p=0,0867$ ) (Figure S2).

The genera *Bacteroides* ( $p=0,0011$ ) and *Parabacteroides* ( $p=5,21E-3$ ) were significantly reduced after DSS administration when compared to the Naïve group (Figure 3 and Table S3). No statistical difference was found regarding the relative abundance of taxa in mice gut with DSS-induced colitis treated or not with the cheese matrix ( $p>0,05$ ). However, mice consuming the single-strain cheese exhibited an increase in the population of

*Helicobacter* ( $p=0,016$ ), *Campylobacter* ( $p=8,72E-3$ ), and *Arcobacter* ( $p=0,026$ ) (Figure 3 and Table S3).

A

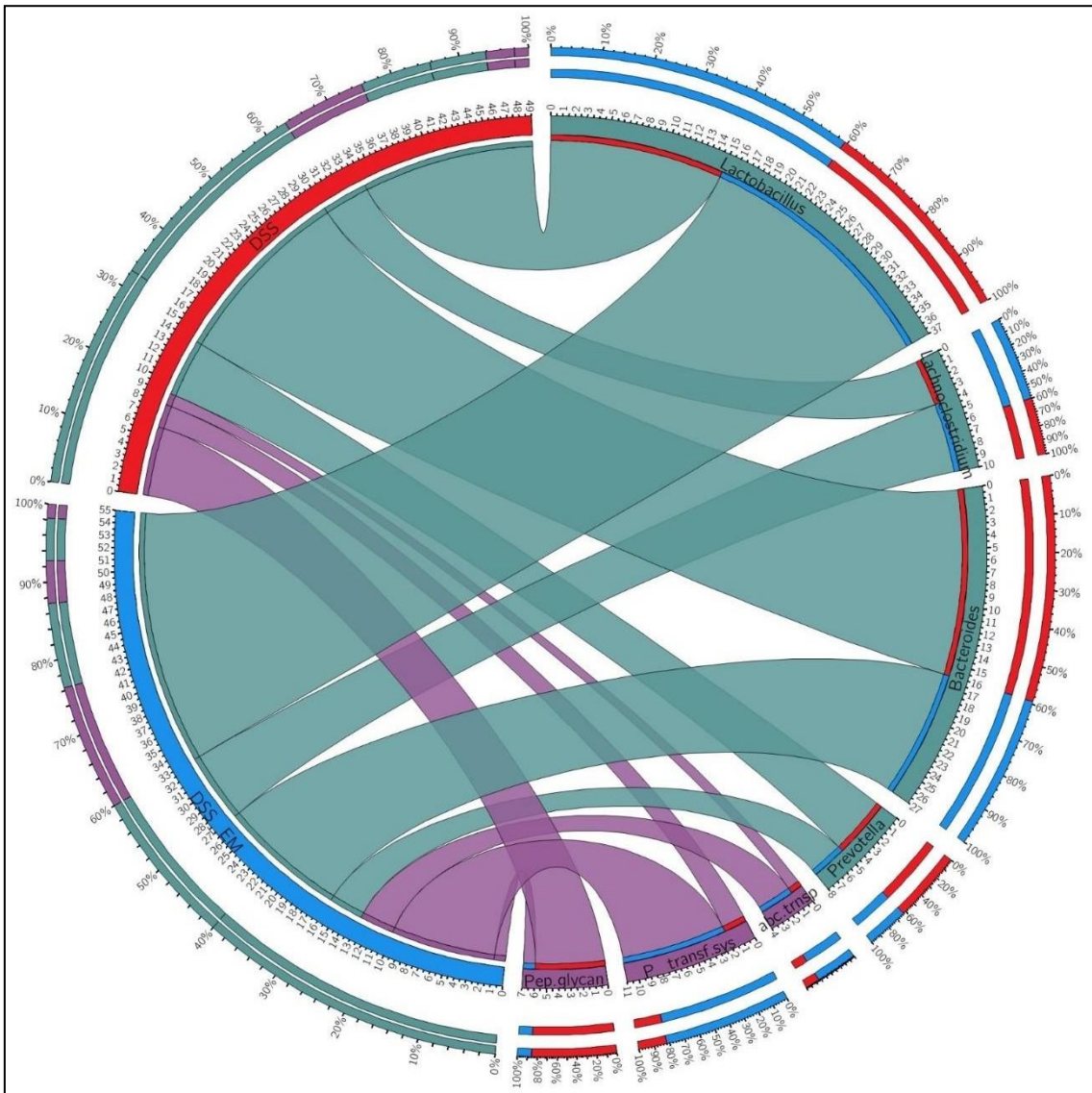


**Figure 3. Heatmap of microbiome taxonomy profile in mice with colitis treated with the Single-strain cheese.** Data in the graph represent the proportion of reads assigned to a given genus-level taxon. Dendrogram represents a hierarchical clustering based on the UPGMA method.

### Microbiota of mice fed with Emmental-type cheese increases in *Lactobacillus* during colitis

*Lactobacillus* exhibited the most increased population in mice treated with the Emmental-type cheese, followed by *Lachnospirillum*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, and *Roseburia* when compared to the DSS Group ( $p<0,05$ ) (Figure 4, Figure S3 and Table S4). The

bacterial genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Curtobacterium*, *Alistipes*, and *Pseudomonas* ( $p < 0.05$ ) were among the taxa with a reduced population in this group.



**Figure 4. Circos plot representing the most enriched taxa and KEGG pathways in mice with colitis treated with Emmental-type cheese.** Data in the graph represent the proportion of reads from samples B246 (DSS group) and B266 (Emmental-type cheese Group) assigned to a given bacterial genus in greyish blue. In purple is the proportion of genes mapped in each KEGG pathway. abc.tnsp stands for ABC Transporters, P.transf.sys for Phosphotransferase system, and Pep.glycan for Peptidoglycan metabolism. Chi-square test: All data represented in the graph were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

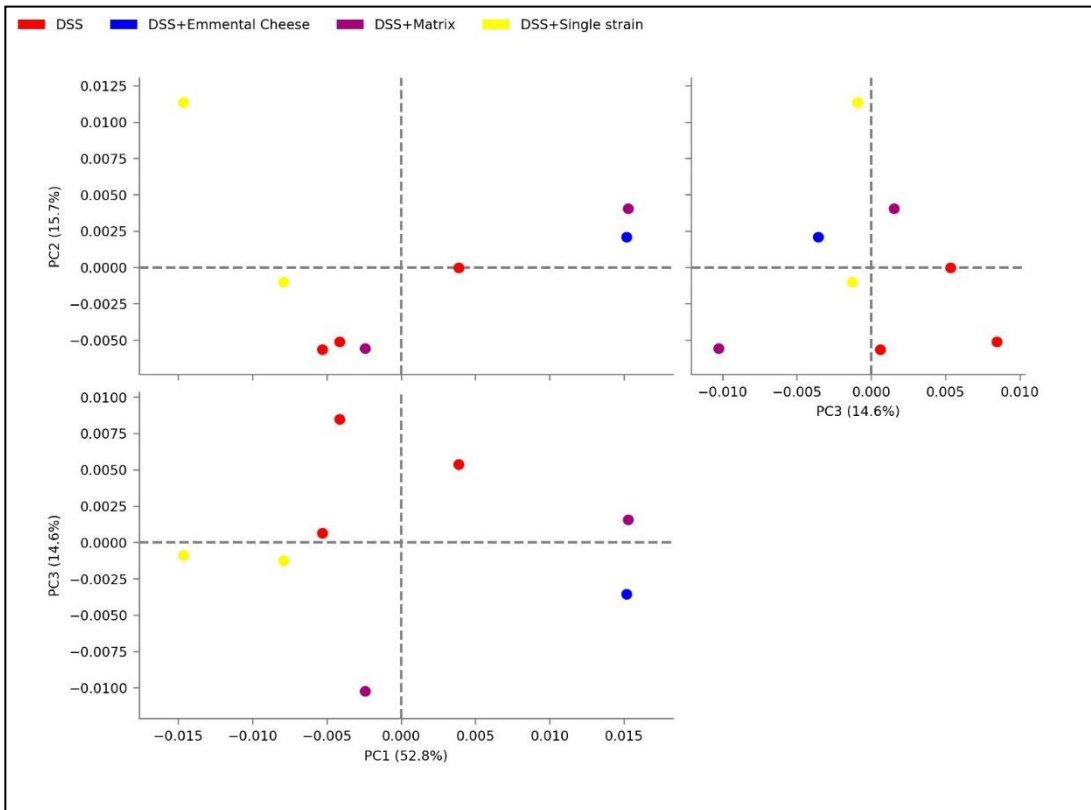
### **Consumption of Single-strain cheese during colitis can restore some of the impaired gut microbiota metabolic functions**

The PCA of the number of genes per KEGG pathway followed by ANOSIM has shown significant differences among the DSS Group and the other groups (Figure 5A and Figure

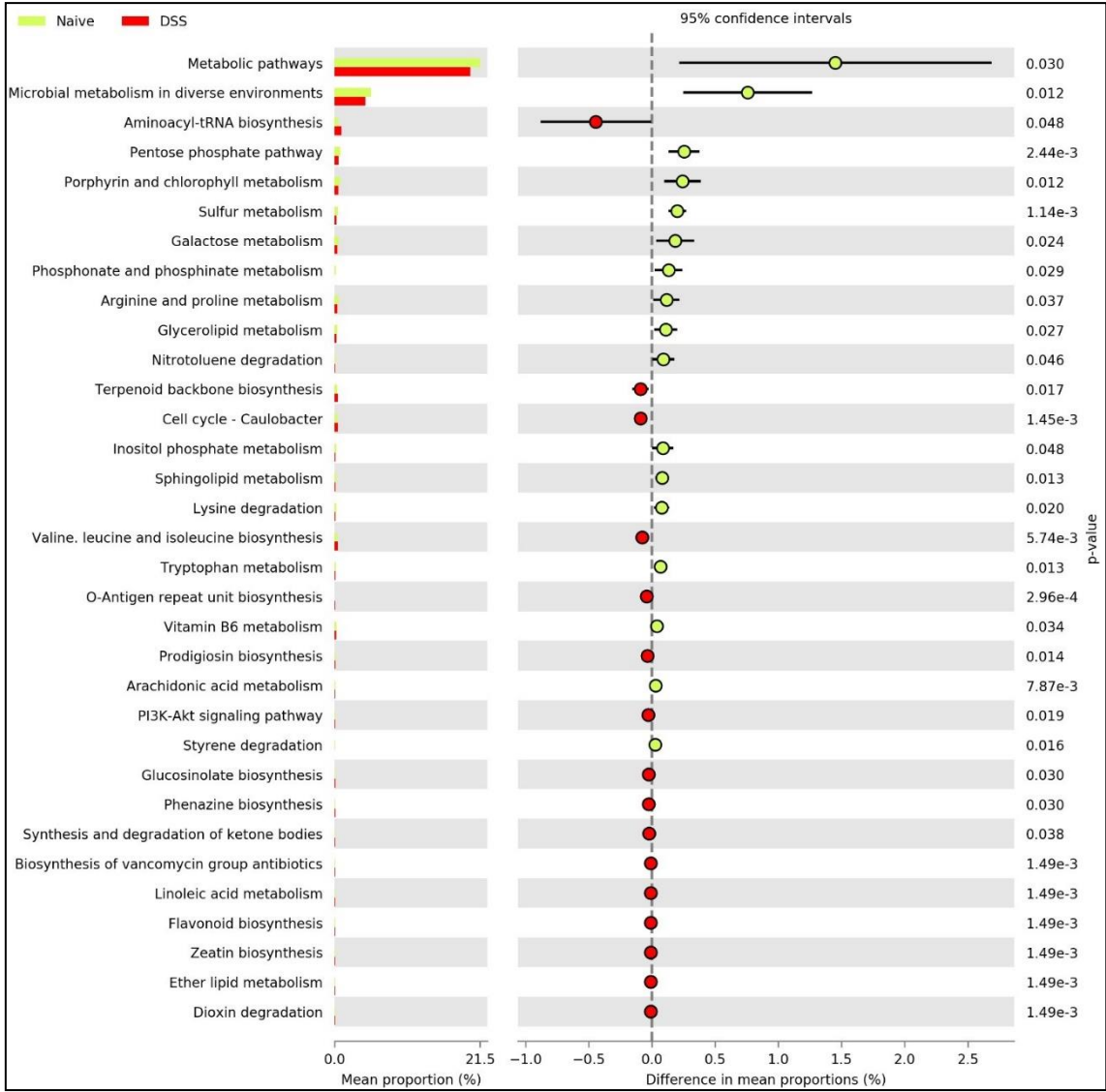
S1) ( $P = 0.0039$ ). Regarding the differentially enriched KEGG pathways among the groups (Figure 4, Figure 5B, C, D, and E and Table S5), the DSS administration caused substantial changes, mainly a reduction in the global metabolic processes (Metabolic pathways and Microbial metabolism in diverse environments) followed by specific metabolic processes such as carbohydrate metabolism (Pentose phosphate pathway, Galactose, and Inositol phosphate metabolism), amino acids metabolism (Arginine, Proline, Tryptophan, and Lysine), Lipid metabolism (Glycerolipid, Sphingolipid and Arachidonic acid), Metabolism of co-factors and vitamins (Porphyrin and Vitamin B6), energy metabolism (Sulfur) and xenobiotics metabolism (Nitrotoluene and Styrene degradation) (Figure 5B and Table S5). However, enrichment was observed regarding other pathways including lipid (Ether lipid and linoleic acid) and amino acid metabolism (Valine, leucine, and isoleucine biosynthesis), biosynthesis of other secondary metabolites (Prodigiosin, Glucosinolate, Phenazine, and Flavonoids), Ketone bodies biosynthesis, Terpenoids metabolism (Terpenoid and zeatin biosynthesis), Glycan biosynthesis (O-Antigen repeat unit) and xenobiotic metabolism (Dioxin). Moreover, some cellular processes involved in translation (Aminoacyl-tRNA biosynthesis) and cell growth and death (Cell cycle – Caulobacter) also increased.

Consumption of the sterile cheese matrix did not present any significant difference when compared to the DSS Group (Figure 5C and Table S5). Mice consuming the Single-strain cheese by contrast exhibited an enrichment of energy metabolism (carbon fixation pathways), carbohydrate metabolism (pyruvate metabolism), and transcription process (RNA polymerase) (Figure 5D). However, purine nucleotide and taurine metabolism were reduced. When comparing DSS+Emmental and DSS groups, Emmental consumption increased the number of genes involved in cellular processes such as membrane transport (ABC transporter and phosphotransferase system), quorum sensing, and beta-lactam resistance. Contrarily, Emmental consumption resulted in a reduction of peptidoglycan metabolism, flagellar assembly, and bacterial chemotaxis (Figure 4 and Figure 5E). Although non-significant, an increase in galactose, starch, and sucrose metabolism was also observed (Figure 5E and Table S6).

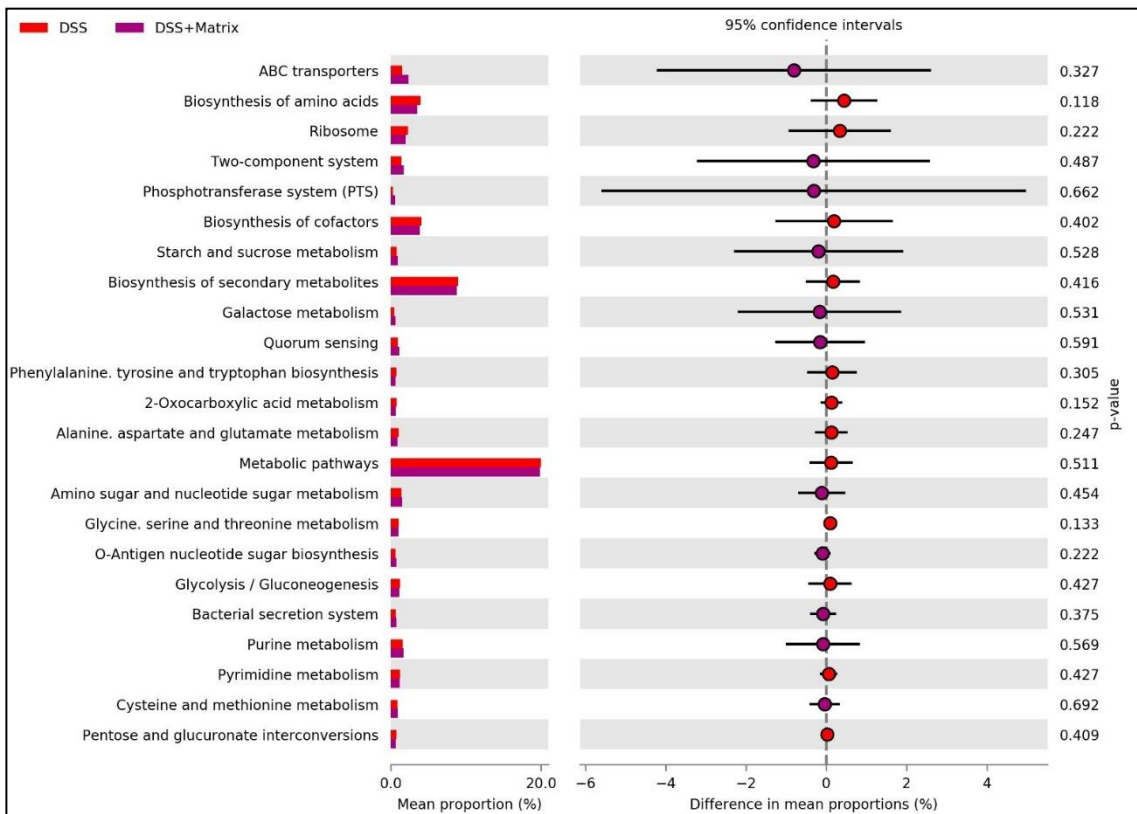
**A**



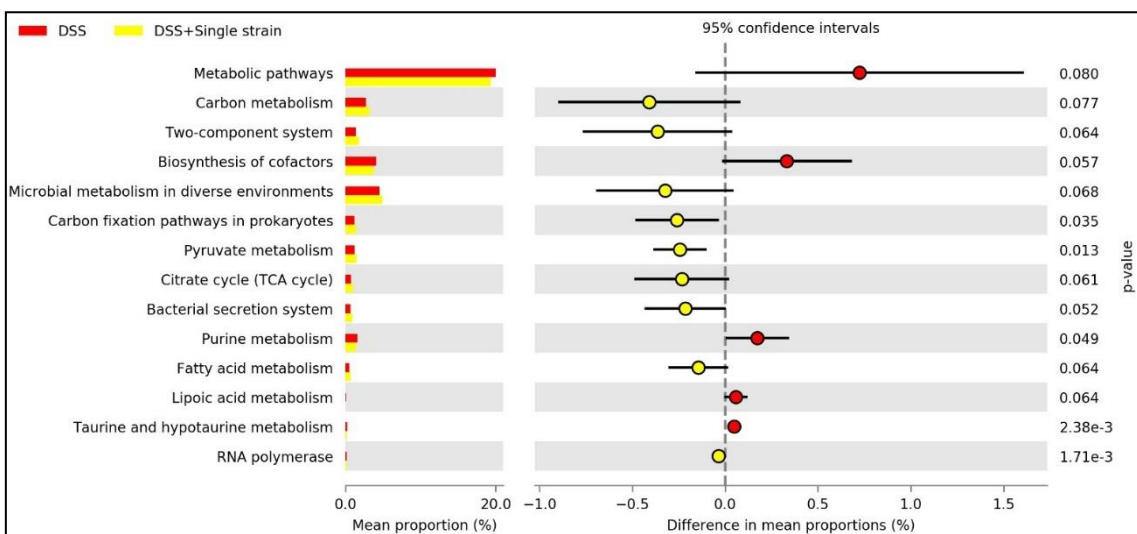
**B**



**C**

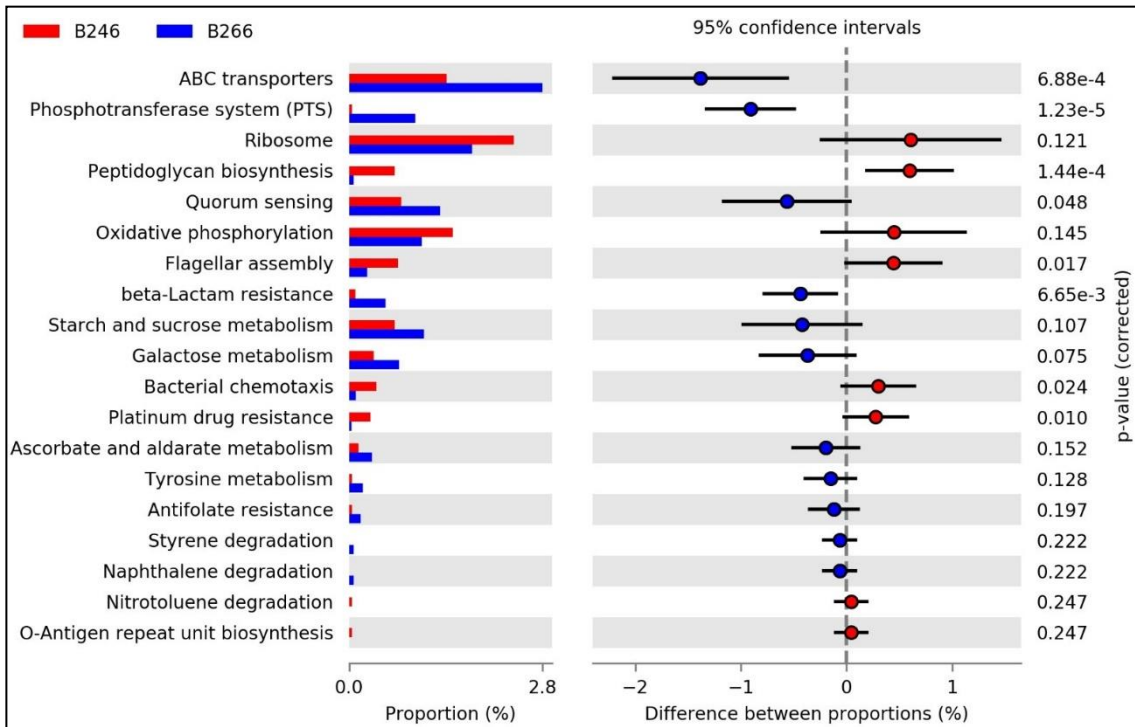


**D**



**E**





**Figure 5. Microbiome functional profile in mice with colitis treated with cheeses.** PCA plot of the number of genes per KEGG pathway in (A). Extended error bar plot showing the differentially enriched pathway between the following groups: Naïve and DSS in (B) DSS and DSS+Cheese matrix in (C); DSS and DSS+Single-strain cheese in (D); DSS (B246) and DSS+Emmental-type cheese (B266) in (E). Welch's test or Chi-square test. Statistical significance when P-value < 0.05.

### Individual taxa contribution analysis and metabolic pathway reconstruction in mice treated with the Emmental-type cheese in healthy and in colitis conditions:

#### *Akkermansia muciniphila* is a major contributor to nervous system functions in healthy mice

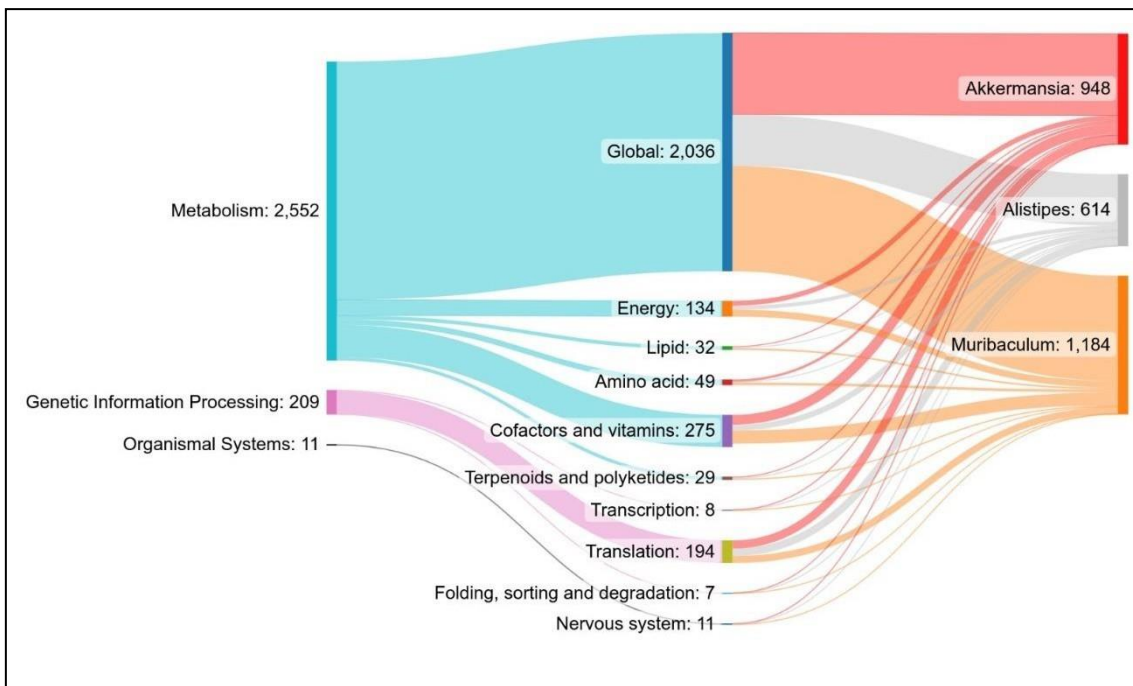
Metagenome Assembled Genomes (MAGs) were recovered from the Emmental Group (sample B238) and taxonomically classified based on Tetra correlation analysis (TCA) against Jspecies database: *Akkermansia muciniphila* (97,9% Completeness, 0,0% Contamination); *Alistipes dispar* (77,2% Completeness, 6,4% Contamination) and *Muribaculum intestinale* (46,5% Completeness, 3,4% Contamination) (Table S7). The phylogenomic analysis has confirmed *Akkermansia muciniphila* taxonomy at the species level (Figure S4). MAGs contribution to biological pathways is shown in Figure 6B and Figure S5. It was observed that the *M. intestinale* genome contains more genes, when compared with the other MAGs, which contribute to functions related to global, co-factor and vitamins, and energy metabolism (carbon fixation, Methane, and Nitrogen), except for sulfur metabolism genes, which were more present in *A. muciniphila* genome. Regarding amino acids metabolism, *A. muciniphila* has more genes contributing to Tryptophan metabolism and genes that interact with GABAergic synapse pathways. Moreover, genetic information processing related to translation and transcription was

more enriched in this bacterium. *At. dispar* genome presented the lowest number of genes contributing to most of the functions.

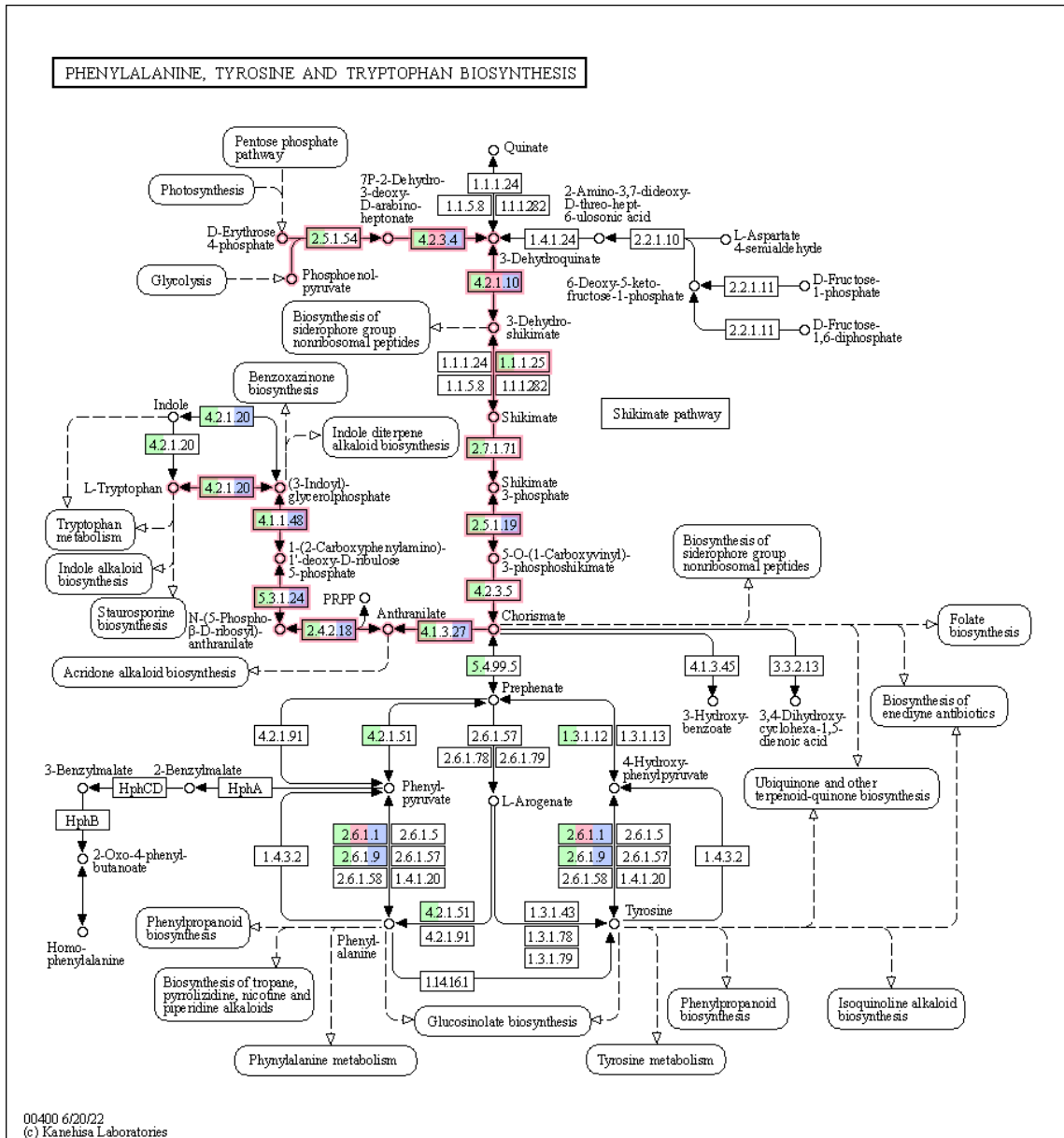
The Integrated metabolic pathways map reconstruction suggested that the *A. muciniphila* genome presented most enzyme genes (13 from 16 genes) required for tryptophan biosynthesis from intermediate metabolites from glycolysis and pentose pathways. Moreover, *M. intestinale* and *At. dispar* can also contribute to 9 and two steps, respectively, in tryptophan biosynthesis (Figure 6B). However, only *At. dispar* genome contained the tryptophanase enzyme gene [EC:4.1.99.1] required to produce Indole (Figure S6).

Regarding the GABAergic synapses pathway, the glutaminase [EC:3.5.1.2] and glutamate decarboxylase [EC:4.1.1.15] genes involved in GABA production by converting glutamate were exclusively found in the *A. muciniphila* genome. At the sametime, the other bacteria only contributed to glutamine and glutamate biosynthesis from the citric acid cycle intermediate metabolites (Figure S6). Sulfur reduction assimilatory metabolism genes were exclusively found in the *A. muciniphila* genome, and the reconstructed map (Figure S6) suggests this bacterium can produce acetate from hydrogen sulfide and serine metabolism through the activity of cysteine synthase [EC:2.5.1.47] and serine O-acetyltransferase [EC:2.3.1.30].

**A**



**B**



**Figure 6. Functional contribution analysis and metabolic pathway reconstruction of MAGs recovered from the Emmental-type group. (A)** Sankey diagram representing MAGs individual contribution in the number of genes to each KEGG pathway levels 2 and 3 categories. **(B)** MAGs Tryptophan metabolism integrated pathway. The EC number boxes' colors represent the taxa: *A. muciniphila* in green; *At. dispar* in pink and *M. intestinale* in blue. Highlighted arrows indicated complete modules.

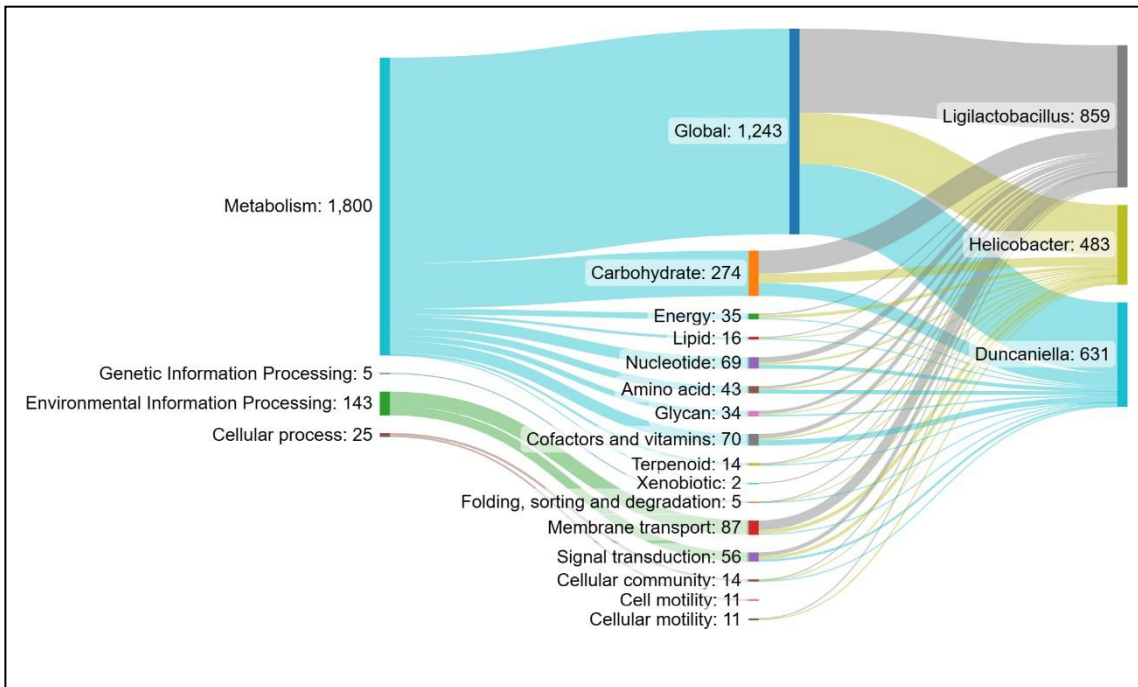
***Ligilactobacillus murinus* is a major contributor to central carbohydrate metabolism in mice microbiome population and presents genes involved in the production of metabolites with potential anti-inflammatory activity**

The TCA-based taxonomy of MAGs recovered from the DSS+Emmental Group (sample B266) was *Ligilactobacillus murinus* (54,0% Completeness and 2,4% Contamination);

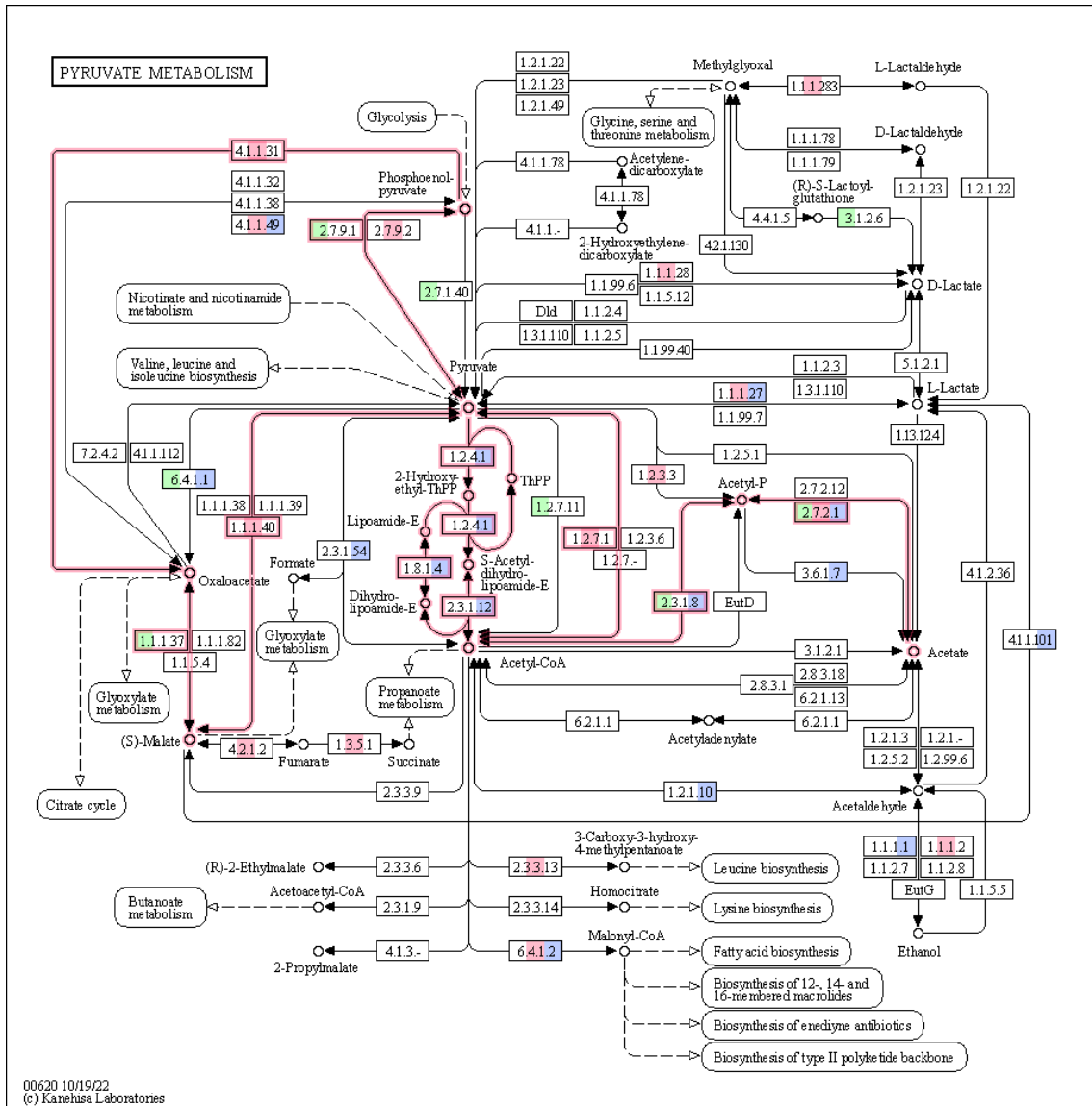
*Duncaniella dubossi* (46,5% Completeness and 10,3% Contamination) and *Helicobacter apodemus* (46,0% Completeness and 9,1% Contamination) (Table S7). The *Lg. murinus* taxonomy was also suggested by the phylogenetic tree (Fig S4). MAGs individual contribution to biological pathways is shown in Figure 7B and Figure S5. Regarding metabolism, global metabolic function genes were more abundant in *Lg. murinus*, followed by *D. dubossi* and *H. apodemus*. *Lg. murinus* was the major contributor to carbohydrate (starch and sucrose, galactose, fructose and mannose), Nucleotide (purine) metabolism. *D. dubossi* and *Lg. murinus* had an equal contribution to amino acids metabolism, although the first bacterium species genes were more related to phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis, while the late species genes were associated with alanine, aspartate, and glutamate metabolism. Energy metabolism genes were predominantly found in *H. apodemus* and primarily associated with oxidative phosphorylation. Most co-factors and vitamin metabolism genes were distributed between the genomes from *Lg. murinus* (vitamin B6 and thiamine metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis), and *D. dubossi* (biotin, riboflavin, and folate metabolism). Regarding environmental and cellular processes, *Lg. murinus* genome contains more genes involved in membrane transport (ABC transporters), signal transduction (two-component system), and biofilm formation.

Reconstructed pathways maps have shown ABC transporters system in the *Lg. murinus* genome was most related to the transport of phosphate, amino acids (glutamine, cystine, arginine, histidine, and lysine), oligopeptides, and inorganic ions (Figure S7). The phosphotransferase system in this bacterium is involved in the uptake of several sugars (glucose, mannose, and fructose), while *H. apodemus* presents only a fructose up-take system (Figure S7). Regarding metabolites with potential anti-inflammatory properties, all three bacteria contribute to acetate production via glycolysis/pyruvate metabolism, although most genes involved in central carbohydrate metabolism were detected in *Lg. murinus* genome (Figure 7B). Moreover, the same bacterium contains glutamate-cysteine ligase [EC:6.3.2.2] required to produce glutathione (Figure S7). Although *D. dubossi* and *Lg. murinus* genomes presented most Co-factors and vitamin metabolism genes. Thiamine, riboflavin, and vitamin B6 pathways lack enzyme genes in their biosynthesis. Regarding lipid metabolism, *H. apodemus*, and *Lg. murinus* contribute to the biosynthesis of phosphatidylethanolamine through the metabolism of glycerophospholipids by phosphatidate cytidylyltransferase [EC:2.7.7.41] and CDPdiglyceride-serine O- phosphatidyl transferase [EC:2.7.8.8].

**A**



**B**



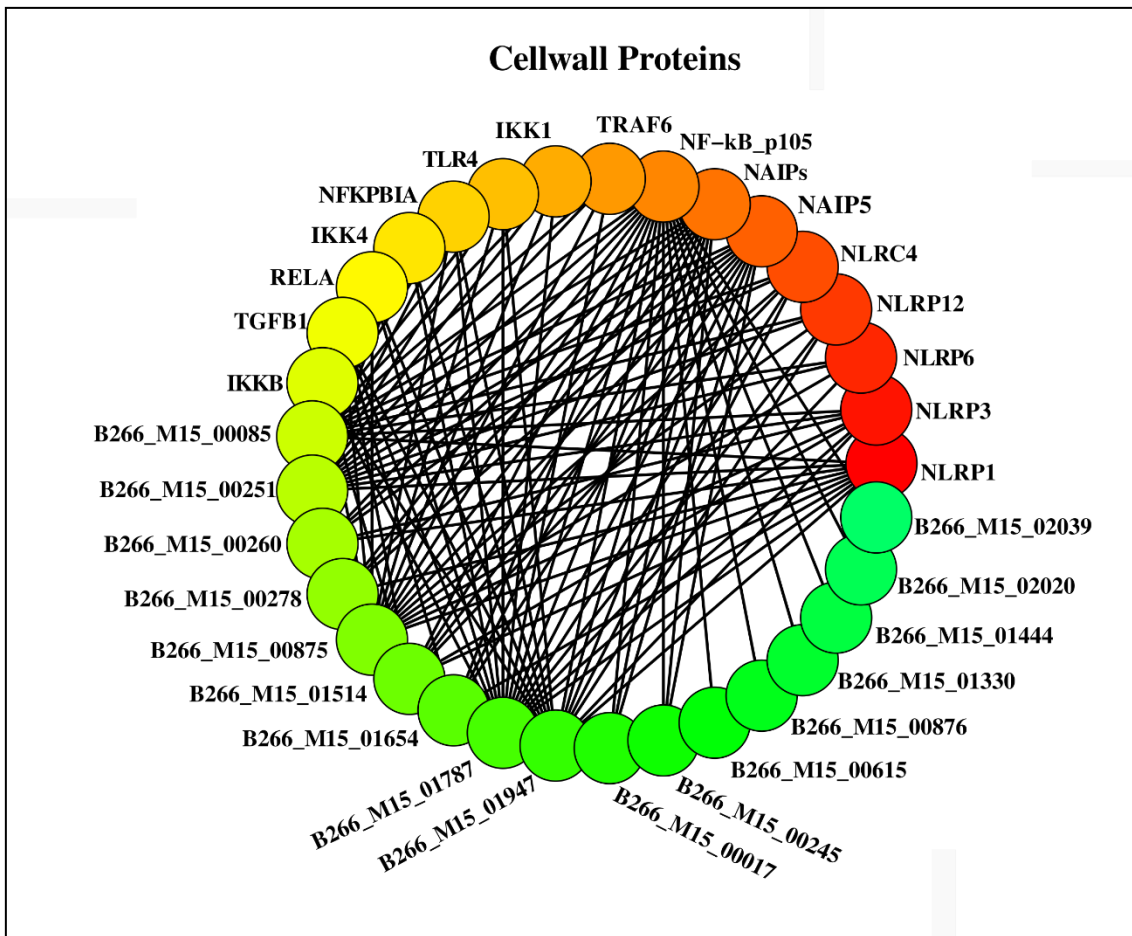
**Figure 7. Functional contribution analysis and metabolic pathway reconstruction of MAGs recovered from DSS+Emmental group.** (A) Sankey diagram representing MAGs individual contribution in the number of genes to each KEGG pathway levels 2 and 3 categories. (B) MAGs Pyruvate metabolism integrated pathway. The colors inside EC number boxes represent the following taxa: *D. dubossi* in green, *H. apodemus* in pink, and *Lg. murinus* in blue. Highlighted arrows indicated complete modules.

### *Ligilactobacillus murinus* presents potential immunomodulatory interaction with the human gut Immune system

*Lg. murinus* presented 20 Cell wall proteins classified as adhesins. From those, 17 proteins were predicted to interact at least with one human protein involved in the inflammasome activation pathway, as shown in Figure 8 and Table S8. Bacterial adhesins presenting the best interaction prediction score (100% identity with known interaction network proteins) were B266-M15-00085, B266-M15-00251, and B266-M15-01787. All three in silico interactions occurred with the NF- $\kappa$ B p105 human protein. In quantitative



terms, most interactions occurred between bacterial proteins and NF- $\kappa$ B p105 (17 interactions), followed by NLRP1 and NAIP5 (11 interactions). InterPRO domain analysis suggests the presence of Mucin-type Glycan binding domains (data not shown).



**Figure 8. Protein-Protein Interaction network between *Lg. murinus* and human Inflammasome activation pathway.** The nodes represent human or bacterial proteins, and lines connecting the nodes indicate interactions. B266-M15 captions represent *Ligilactobacillus murinus* MAG predicted proteins from sample B266 (DSS+Emmental Group).

## Discussion Homeostasis

### context

Consumption of both experimental kinds of cheese, in a healthy or colitis context, promoted distinct changes in mice microbial communities. The present study revealed that five-day diet complementation based on the control sterile cheese matrix, on a Swiss-type cheese exclusively fermented by *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 or on an Emmental cheese manufactured using *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 in association with *L. delbrueckii* CNRZ327 and *S. thermophilus* LMD-9 as starters, does not cause long-term shifts of the gut microbiota. In particular, no unbalanced composition

(dysbiotic) profile was observed in healthy mice. In this context, we observed that microbial diversity was kept, and most of the taxa found in the normal microbiome exhibited no significant changes in population sizes after the three complementation rounds. Moreover, PCA and ANOSIM analysis regarding KEGG functional profiling support these findings and suggested that none of the experimental cheeses impaired fundamental microbiota functions. Therefore, they might be safe for healthy consumers.

Considering the effects promoted by the sterile cheese matrix composed of an acidified curd-like mixture of cow milk fat, protein, and carbohydrate, the microbiota cellular process involved in genetic information processing like Sulfur relay system, RNAPolymerase, and phosphatidylinositol 3'-kinase(PI3K)-Akt signaling functions were found enriched. One factor associated with the modulation of such functions is the cheesematrix's acidic (pH 5.5) condition. In this context, gut microorganisms with greater capacity to adapt and survive in this environment could have expanded, such as the increase in Sulfur relay system genes involved in many Post-transcriptional RNA modifications [11]. Moreover, the gene mapping in the PI3K-Akt signaling pathway was predicted as a heat shock protein chaperone when aligned to Uniprot Protein DB (98,02% Identity, A0A1B1SDF3), hence, supporting the stress adaptation hypothesis. It was also expected that the cheese matrix substrate could work as a prebiotic factor for the gut bacteria, as suggested previously [12]. These genes were also increased in mice receiving the Emmental type cheese. In this case, the acidification of the cheese promoted by the production of propionic and acetic acid, as a result of propionibacteria fermentation could be involved in selecting low pH stress tolerating mechanisms.

Swiss-type cheeses are usually high-fat, and therefore the excess of lipids could provide a niche for other lipolytic bacteria in the gut [10]. Consuming cheese containing only *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 induced the enrichment of lipid metabolism capacities, such as the increase in Fatty acid biosynthesis genes and a decrease in the biosynthesis of LPS. This effect was not observed in mice consuming the Emmental-type cheese containing the thermophilic Lactic Acid Bacteria strains, suggesting that their lipolytic activity might complement propionibacteria in the breakdown of lipids. The impact of the enrichment in lipolysis promoted by commensal bacteria in the host functions is largely unknown and should be further investigated. On the other hand, LPS are glycans produced by Gram-negative bacteria and have been strongly associated with the stimulation of pro-inflammatory responses in the gut [9]. Our study found the LPS biosynthesis pathway incomplete in the normal microbiota. The number of genes in this pathway was further reduced after treatment with the cheese containing only *P. freudenreichii* CIRM-BIA129, suggesting this approach could help prevent the initiation of an inflammatory process.

Xenobiotics degradation genes were predicted within the gut microbiome of control mice and of mice consuming the Emmental cheese. An increase in Benzoate metabolism genes was observed after cheese consumption. However, other xenobiotics metabolism genes, such as styrene and caprolactam, were absent in these animals. Sodium benzoate is widely used for the preservation of fermented foods, including cheeses. It is furthermore produced from hippuric acid and phenylalanine metabolism because of bacterial fermentation in cheese [13]. Studies have pointed out that frequent exposure to



xenobiotics from the diet may have allowed gut microbes to evolve the capacity to metabolize them [14], [15].

In contrast to the Single-strain cheese, the Emmental-type cheese was prepared following an industrial scale process, which could explain the increase in xenobiotic degradation. Natural preservatives in the food industry are replacing Sodium Benzoate, and we suggest this improvement should be considered for the development of safer functional foods as these metabolites have been associated with toxic effects when consumed in high concentrations [16]. Another crucial metabolic function affected by the experimental Emmental cheese consumption in healthy mice was the decrease in Amino sugar and nucleotide sugar metabolism. This pathway involves many glycation processes of lipids and proteins in bacteria, including peptidoglycan or O-antigen (LPS) biosynthesis. Pathway reconstruction analysis suggests the microbiome of Emmental treated mice kept the ability to phosphorylate D-galactose and D-glucose but lacked the D-hexose 6- phosphotransferase gene, indicating a limited capacity regarding sugars like mannose and fructose (data not shown). This effect could result from a low-carbohydrate diet as most of the milk sugar is probably consumed by the starter bacteria used for cheese fermentation.

Sulfur metabolism is critical in the host and microbiota functions, including physiologic and pathogenic ones. Sulfate substrates can be found in the gastrointestinal tract in the inorganic form or conjugated with organic substances such as mucin proteins, bile acid, and amino acids from the diet [14]. The present report suggests a decrease in sulfur metabolism, caused by Emmental consumption, as indicated by a lack of genes involved in the uptake of inorganic Sulfate. The gut microbiota however kept the ability to obtain sulfate from Sulfonated organic compounds. Interestingly, this result corroborates with the partial increase in *A. muciniphila*, which has been reported as a probiotic mucin scavenger bacterium in the gut [17]. Furthermore, two kinds of sulfate-degrading microorganisms have been described in the bacteria kingdom: (i) Sulfidogenic, such as *Desulfovibrio* spp. or *Bilophila* spp, which use sulfate as a final electron acceptor to generate energy and produce inorganic hydrogen sulfide (HS) as an end-product that can be toxic when produced in large amounts and has been associated with IBD pathogenesis [18]; (ii) Sulfate assimilatory, including *A. muciniphila*, that consume energy to incorporate Sulfate in several organic compounds, including peptides and amino acids and may produce secondary metabolites which can be used as a carbon source for other commensal bacteria [19]. The *A. muciniphila* genome recovered from a metagenome sample (B238) from a mouse consuming Emmental revealed a complete Sulfur assimilatory pathway. Moreover, pathway contribution analysis supported beneficial properties modulated by Emmental consumption, as it was shown this *Akkermansia* along with Bacteroidales members, *Alistipes*, and *Muribaculum*, may produce acetate via sulfur metabolism, Indole and GABA via amino acids degradation, all considered key metabolites in the regulation of the host immune system in intestinal and gut-brain axis inflammatory disorders [20], [21].

Previous studies have reported that proteolysis of Casein, milk's most abundant protein, can produce bioactive Glycomacropeptides (GMP) containing mucin-type carbohydrate chains such as N-acetylgalactosamine and N-acetylneuraminic acid [12]. Milk mucin- type GMPs are rich in galactose, glutamate, and serine. They, therefore, could provide

the primary substrate for *A. muciniphila* to produce metabolites with neuromodulatory properties such as Indole, GABA, and Acetate, respectively, as suggested by pathway reconstruction and contribution analysis performed in our study. A prebiotic formulation that increased *Akkermansia* based on sialyl glycopeptide (SGP) extracted from milk GMP was recently developed and patented (JP2019043867A) in Japan. These results together suggest that the synergic proteolytic activity of the thermophilic bacteria *L. delbrueckii* and *S. thermophilus* in the fermentation process of Emmental cheese might have a crucial role in the enrichment of *A. muciniphila* in the gut. Therefore, we suggest that selecting probiotic strains with appropriate proteolytic activity, generating GMP might be the key to developing functional dairy foods to promote the enrichment of this bacterium in the gut.

Another common member of the typical mammalian microbiota, *Romboutsia*, was increased around ten times when mice consumed the Emmental-type cheese. Interestingly, this genus has been found enriched in rat microbiota after receiving a mix of lactobacilli probiotic strains [22]. This genus is an anaerobic member of the Firmicutes phylum and is closely related to *Clostridium* sp. Its role in the gut microbiota is poorly understood. However, it is known that the primary metabolic end-products of the type species *R. idealis* are SCFA, acetate, and formate when cultivated in artificial media [23]. We could not investigate the presence of the possible genes associated with SCFA biosynthesis in this bacterium due to the small number of reads obtained.

### Inflammation context

DSS administration did not affect the microbiota diversity regardless of the type of cheese treatment. It did, however, modify the gut population of genera *Bacteroides* and *Parabacteroides*, as well as the gene content as expected of imbalanced community shifts found in IBD patients [22]. Carbohydrate metabolism was the most affected KEGG pathway, with fewer genes in the context of colitis. Among the pathways that conversely exhibited an enrichment, the O-Glycan biosynthesis pathway was noticed. The concomitant increase of Gram-negative bacteria such as *Helicobacter* spp. can explain this finding.

Interestingly, PCA and ANOSIM revealed functional dissimilarity between the DSS control group and groups of inflamed mice consuming cheese, suggesting different signatures in microbiome structures. While cheese matrix consumption has not shown any improvement in structural and functional aspects, our results suggest that consuming single-strain cheese could restore some of the impaired metabolic functions related to carbohydrate metabolism, including pyruvate and carbon fixation pathways. However, it could not contain the growth of *Helicobacter* spp., which is considered an opportunistic commensal in rodent gut [24]. This finding is intriguing as we have previously reported that the cheese fermented exclusively with *P. freudenreichii* could ameliorate inflammatory markers in murine DSS-induced colitis, such as reduced TNF and IFN- $\gamma$  [4]. LPS (O-antigens) from *Helicobacter* spp. possess weak pro-inflammatory effects but are vital for the persistence of the bacterium by providing camouflage as it mimics glycans present in the gastrointestinal mucosa [25]. We hypothesize that despite the anti-inflammatory properties of *P. freudenreichii*, the prebiotic factors and

environment acidification of the cheese could have allowed the expansion of *Helicobacter* as this microorganism presents resistance mechanisms such as Urease coding genes for tolerating low pH [24].

In contrast, the consumption of the Emmental-type cheese enhanced the intestinal population of the lactobacilaceae *Lg. murinus*. This bacterium has shown promising probiotic properties in treating intestinal inflammation disorders; and a recent study has reported its ability to alleviate DSS-induced colitis in mice [19], [26]. Another crucial functional impact of Emmental-type cheese consumption in mice with DSS-induced colitis was the increased diversity of sugars and amino acids uptake systems (ABC transporters systems and phosphotransferases systems) found in *Lg murinus* MAG, suggesting an improved capacity to adapt and assimilate different kinds of nutrients. While *Duncaniella* spp. MAG shares many genes in common involved in global metabolism, *Lg. murinus* MAG presented a higher abundance of genes involved in producing metabolites with potential anti-inflammatory activity, such as acetate and glutathione.

Furthermore, PPI analysis suggested the ability of *Lg. murinus* cell wall layer adhesin proteins to exert an immunomodulatory activity by interacting with human and mouse Inflammasome sensor proteins, mainly NLRP1 and NAIP5. Additionally, the NF- $\kappa$ B p105 subunit is predicted to interact with several ligands from this bacterium cell wall. Commensal probiotic strains have been reported to possess immunomodulatory properties related to NLRP1 and NAIP5 inflammasome attenuation and regulation of inflammation markers by inhibiting the NF- $\kappa$ B complex formation [27]–[29]. These findings corroborate our previous study, showing that the Emmental cheese diet reduced the expression of IFN- $\gamma$  and TNF and prevented tissue damage caused by DSS in mice [4]. This might explain the mechanism behind its beneficial properties. However, further investigations are required to confirm whether these interactions involve inhibitory or activation mechanisms. In addition, these results suggest that *Lg. murinus* adhesins may provide competition with other luminal ligands as toxins and antigens from commensal pathobionts such as *H. apodemus*.

## Conclusions

This study concludes that experimental Emmental-type cheese is safe for healthy consumers and may promote the increased capacity of the microbiota to produce metabolites with neuromodulation properties in gut-brain axis regulation. However, further studies are required to fully characterize the impact of cheeses on the central nervous system and neurodegenerative diseases. Furthermore, our results suggest possible anti-inflammatory mechanisms based on the interaction of enriched commensal *Lg. murinus* with the gut immune system.

## Material and Methods

### Cheeses preparation and bacterial strains

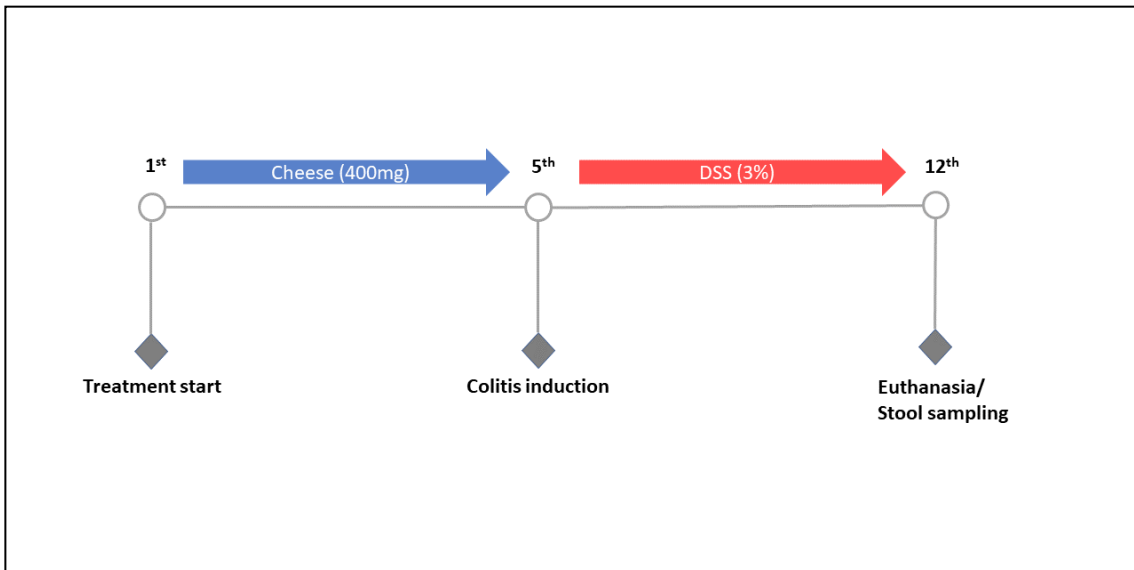
Cheeses were manufactured as described in a previous study [4]. For a control sterile matrix preparation, UHT cow milk was added with milk proteins and cream before acidification using Glucono Delta Lactone, moulding, pressing, drying, and wrapping. An experimental single-strain cheese was prepared the same way following the growth of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA129 in UHT milk. Finally, an Emmentalcheese was manufactured at an industrial scale by the Entremont alliance company (Malestroit, France). *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CNRZ327, *Streptococcus thermophilus* LMD-9 and *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 were used as starters in this industrial Emmental cheese. All bacterial strains were provided by the international microbiological resource centre CIRM-BIA (Centre International de Ressources Microbiennes, Bactéries d'Intérêt, France). A sterile mixture of cow milk, milk cream, and casein peptone was used as the substrate matrix for starter bacteria. For the placebo control, a solution of Glucono Delta Lactone was used to reproduce acidification during fermentation (pH 5.5).

### **Animal experiments and sample collection**

The present study used the same mice as previously in Rabah and Colleagues (2018). Female C57BL6 mice between six and eight weeks were obtained from the Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil). The study was approved by the Brazilian Ethics Committee on Animal Use (CEUA, Brazil, protocol 364/2018), and the animals were housed in a 12 h/12 h light/dark cycle-controlled room with a temperature of 25 °C and unrestricted access to standard chow and filtered water before the experiment. We, at this moment, confirm that the study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

For the *in vivo* assay, a colitis preventive treatment protocol was followed, as shown in Figure 9. Mice were divided into eight groups (n= 6). The first four groups consisted of noninflamed mice pre-treated with probiotic cheeses for five days: (i) the negative control (Naïve group), which did not receive any treatment; (ii) the Matrix group, receiving 400mg of a sterile nonfermented cheese matrix daily by gavage; (iii) Single-strain and (iv) Emmental groups which received daily gavage with 400 mg of cheeses prepared as described above.

The remaining four groups were composed of mice pre-treated with probiotic cheeses for five days and challenged with colitis induced by drinking 3% dextran sulfate sodium (DSS) (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstadenn, France) during seven days: (v) DSS control group, mice receiving DSS treated with PBS (Phosphate-Buffered Saline); (vi) DSS-Matrix group, receiving DSS and fed with the nonfermented cheese matrix; (vii) DSS+Single-strain and (viii) DSS+Emmental groups, mice receiving DSS and fed by gavage either with experimental or conventional Emmental cheeses. All mice were euthanized on the 12<sup>th</sup> day of the experiment, followed by stool samples collected and stored at -80 °C.



**Figure 9. Colitis pre-treatment in C57BL6 mice with experimental cheeses.** Intragastric gavage was administered to the cheeses daily (400mg of cheese in 500  $\mu$ l PBS pH 7.4). DSS 3% solution was administered daily in drinking water. 100mg of micestool samples were collected after euthanasia.

### Metagenomic DNA isolation and Sequencing

Total DNA was extracted from 48 mice stool samples (100 mg) from (8 groups with six animals each, following QIAamp DNASTool Mini Kit protocol (Qiagen) recommendations and used to prepare whole shotgun metagenomic libraries performed with the Illumina TruSeq DNA Sample Preparation kit. The Metagenomic DNA libraries were sequenced using the HiSeq 2500 platform (Illumina) with paired-end ( $2 \times 150$  bp) reads with inserts size of 450bp. Sixteen samples could not be sequenced due to the low yield of high-quality DNA. A summary of the amounts of reads obtained for each sample is shown in Table S9.

### Public genomes used in this study

Datasets of 97 complete public genomes of *Akkermansia spp.* strains and 17 *Ligilactobacillus* representative species were downloaded from the NCBI RefSeq genome database (accessed Sept. 23, 2022) for the phylogenomic analyses. The accession number of all genomes is shown in Table S10.

### Microbiome taxonomy and function profiling

FastQ file base quality was verified using FastQC v.0.11.9 tool, and the low-quality reads (Phred < 30) were filtered using Fastp v. 0.232 software. A 150pb read-based taxonomic classification was performed using kaiju v1.9.2 software [30], aligning the sequences to the NCBI BLAST nr +euk sequences database. Afterwards, the relative abundances of bacterial taxa in the samples were estimated and statistically compared using RStudio

built-in functions and STAMP v2.1.3 software. A diversity analysis was conducted by estimating the Shannon index using the Vegan package for RStudio.

The reads classified as Bacteria were extracted and submitted for a *de novo* assembly using the megahit v.1.2.9 tool for functional analysis. Following the assembly, contigs were annotated using Prokka v1.14.5. An enrichment analysis based on orthologs was performed using the KEGG database, and the number of genes for each category/pathway was compared statistically among the groups using the same tools described above.

A normality test was performed using the Shapiro-Wilk test for the comparative analyses performed among the groups (n=6). ANOVA or Kruskal-Wallis's test was used for data presenting either Gaussian or asymmetric distribution, respectively, followed by Tukey or Welch's T-test for Post hoc analysis. A Chi-square hypothesis test was used to compare data from the DSS-Emmental group (n=1) to other groups. For Principal Component Analysis (PCA) data, an Analysis of similarities (ANOSIM) was performed. Significant differences were considered when the P-value < 0,05.

### **MAGs reconstruction and individual taxa contribution analysis**

To evaluate the individual functional contribution of taxa, *de novo* assembled contigs (minimum length = 1000pb) from one sample selected from the group Emmental and one sample from the DSS-Emmental group was used for recovering metagenome-assembled genomes (MAG) based on a binning algorithm performed by the MaxBin2 v. 1.2.0 tool [31]. The MAG completeness and contamination were verified using CheckM v1.2.2 software. The taxonomy at the species level was investigated by tetranucleotide pairwise alignment against the JSpeciesWS tool genomesDB database followed by a multi-locus (92 single copy orthologous genes) phylogeny using the Up-to-date bacterial core gene (UBCG) v. 3.0 tool. The trees were built using the Maximum Likelihood method with 1000 Bootstrap replicates. For this step, it was used a dataset of complete public genomes described in item 2.4. Afterwards, the number of genes per KEGG pathway for each MAG was estimated, as described above, compared, and clustered in a heatmap plot using the Pheatmap package for Rstudio. Then, the list of genes from all MAGs was mapped to KEGG pathways using the KEGGmapper tool. All the maps (map00620, map04727, map00400, map00380, map00250, map00920, map02010, map02060, and map00480) used for the reconstruction and visualization of MAGs integrated metabolic pathways were initially generated by Kanehisa laboratories [32].

### **Identification of MAGs cell-adhesion related sequences and Protein-Protein Interaction with human gut Inflammatory pathways**

Translated amino acid sequences from the MAG B266-M15 (*Ligilactobacillus murinus*) were submitted to the PsortB (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>) v3.0 (accessed on 02/02/23) web-platform for extraction of proteins located on Cell Wall surface. Subsequently, all cytoplasmic proteins were submitted to Vaxign2 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkab279>) (accessed on 02/02/23) to select adhesin-related proteins, considering a 60% probability cutoff. Human, mice, and homologous pig

proteins were discarded. Afterwards, Protein-Protein Interaction (PPI) was performed with human inflammasome key proteins (<https://doi.org/10.1038/mi.2017.19>, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040829>). The GenBank ID for the 17 selected proteins is available in Table 1. For this step, cell adhesion-related proteins were submitted on INTERSPPI - Human&Bacteria v3 (10.1021/acs.jproteome.9b00074) (accessed on 02/03/23) to predict PPI, considering a 97% of identity against the platformdatabases and 95% interaction probability cutoff. Networks were plotted in the Rstudio igraph package and Python networkx and pyvis packages.

**Table 1. Inflammasome pathways-associated proteins in this study.**

<b>Protein</b>	<b>GenBank ID</b>
NLRP1	NP_127497.1
NLRP3	NP_001230062.1
NLRP6	NP_612202.2
NLRP12	NP_653288.1
NLRC4	NP_001186067.1
AIM2	NP_004824.1
NAIP5	Q9R016.3
NAIPs	AAI36274.1
NFk-B_p105	NP_003989.2
TRAF6	NP_004611.1
IRAK1	NP_001560.2
IRAK4	NP_057207.2
TLR4	NP_612564.1
NKFPBIA	NP_065390.1
RELA	NP_068810.3
TGFB1	NP_001278963.1
IKKB	O14920.1

## Declarations

### Ethics approval and Consent to participate

The study was approved by the Brazilian Ethics Committee on Animal Use (CEUA, Brazil, protocol 364/2018). We, at this moment, confirm that the study was carried out in compliance with the AVMA guidelines.

### Consent for publication

Not applicable.

### Availability of data and materials

The experimental data and the simulation results that support the findings of this study are available in Figshare with the identifier <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22495765>. SRA data were deposited into NCBI under Bioproject ID PRJNA951221.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG.

### Authors' contributions

**Rodrigo Carvalho:** Investigation, Formal analysis, Visualization, Methodology, Writing - original draft, review & editing. **Houem Rabbah:** Investigation, Methodology. **Filipe do Carmo:** Investigation, Methodology. **Juan Ariute:** Formal analysis, Visualization. **Flávia Aburjaile:** Supervision, Writing - review & editing. **Bertram Brenig:** Resources, Methodology. **Yves Le Loir:** Funding acquisition, Project administration. **Eric Guédon:** Writing - review & editing. **Gwénaél Jan:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing. **Vasco Azevedo:** Project administration, Resources, Supervision, Funding acquisition, Writing - review & editing.

### Acknowledgements



The authors thank the Rede de Ciências Ômicas (RECOM) network for its scientific support.

## References

- [1] A. N. Ananthakrishnan, “Epidemiology and risk factors for IBD,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2015, doi: 10.1038/nrgastro.2015.34.
- [2] D. W. Shin and B. O. Lim, “Nutritional Interventions Using Functional Foods and Nutraceuticals to Improve Inflammatory Bowel Disease,” *J. Med. Food*, vol. 23, no. 11, pp. 1136–1145, Nov. 2020, doi: 10.1089/jmf.2020.4712.
- [3] W. Zhu, L. Ren, L. Zhang, Q. Qiao, M. Z. Farooq, and Q. Xu, “The Potential of Food Protein-Derived Bioactive Peptides against Chronic Intestinal Inflammation,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2020, p. 6817156, Sep. 2020, doi: 10.1155/2020/6817156.
- [4] H. Rabah *et al.*, “Beneficial Propionibacteria within a Probiotic Emmental Cheese: Impact on Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis in Mice,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 3, p. 380, Mar. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8030380.
- [5] C. S. Rocha *et al.*, “Local and Systemic Immune Mechanisms Underlying the Anti-Colitis Effects of the Dairy Bacterium *Lactobacillus delbrueckii*,” *PLOS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e85923, Jan. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0085923.
- [6] L. A. David *et al.*, “Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome,” *Nature*, vol. 505, no. 7484, Art. no. 7484, Jan. 2014, doi: 10.1038/nature12820.
- [7] H. Aslam *et al.*, “The effects of dairy and dairy derivatives on the gut microbiota: a systematic literature review,” *Gut Microbes*, vol. 12, no. 1, p. 1799533, Nov. 2020, doi: 10.1080/19490976.2020.1799533.
- [8] A. Lerner, T. Matthias, and R. Aminov, “Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1630, Nov. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01630.
- [9] C. L. Boulangé, A. L. Neves, J. Chilloux, J. K. Nicholson, and M.-E. Dumas, “Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease,” *Genome Med.*, vol. 8, no. 1, p. 42, Apr. 2016, doi: 10.1186/s13073-016-0303-2.
- [10] M. R. Damián *et al.*, “Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics: A Focus on Human Health,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 5, p. 1065, May 2022, doi: 10.3390/microorganisms10051065.
- [11] A. Noma, Y. Sakaguchi, and T. Suzuki, “Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 4, pp. 1335–1352, Mar. 2009, doi: 10.1093/nar/gkn1023.
- [12] E. A. Sawin *et al.*, “Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice,” *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 309, no. 7, pp. G590–G601, Oct. 2015, doi: 10.1152/ajpgi.00211.2015.
- [13] R. Sieber, U. Bütikofer, and J. O. Bosset, “Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese,” *Int. Dairy J.*, vol. 5, no. 3, pp. 227–246, Jan. 1995, doi: 10.1016/0958-6946(94)00005-A.

- [14] N. Koppel, V. M. Rekdal, and E. P. Balskus, “Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota,” *Science*, vol. 356, no. 6344, p. eaag2770, 2018, doi: 10.1126/science.aag2770.
- [15] M. Yadav, A. Lomash, S. Kapoor, R. Pandey, and N. S. Chauhan, “Mapping of the benzoate metabolism by human gut microbiome indicates food-derived metagenome evolution,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-84964-6.
- [16] Ł. J. Walczak-Nowicka and M. Herbet, “Sodium Benzoate—Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review,” *Nutrients*, vol. 14, no. 7, p. 1497, Apr. 2022, doi: 10.3390/nu14071497.
- [17] M.-J. Liu *et al.*, “Recent findings in Akkermansia muciniphila-regulated metabolism and its role in intestinal diseases,” *Clin. Nutr.*, vol. 41, no. 10, pp. 2333–2344, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.clnu.2022.08.029.
- [18] Y. Feng, A. J. M. Stams, Willem. M. de Vos, and I. Sánchez-Andrea, “Enrichment of sulfidogenic bacteria from the human intestinal tract,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 364, no. 4, p. fnx028, Feb. 2017, doi: 10.1093/femsle/fnx028.
- [19] B. Wang *et al.*, “Stable colonization of Akkermansia muciniphila educates host intestinal microecology and immunity to battle against inflammatory intestinal diseases,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 55, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1038/s12276-022-00911-z.
- [20] Y. Chen, J. Xu, and Y. Chen, “Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders,” *Nutrients*, vol. 13, no. 6, p. 2099, Jun. 2021, doi: 10.3390/nu13062099.
- [21] M. Jaglin *et al.*, “Indole, a Signaling Molecule Produced by the Gut Microbiota, Negatively Impacts Emotional Behaviors in Rats,” *Front. Neurosci.*, vol. 12, p. 216, Apr. 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00216.
- [22] J. Gerritsen *et al.*, “Correlation between Protection against Sepsis by Probiotic Therapy and Stimulation of a Novel Bacterial Phylotype,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 21, pp. 7749–7756, Nov. 2011, doi: 10.1128/AEM.05428-11.
- [23] J. Gerritsen *et al.*, “Characterization of Romboutsia ilealis gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus Clostridium into the genera Romboutsia gen. nov., Intestinibacter gen. nov., Terrisporobacter gen. nov. and Asaccharospora gen. nov.,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 64, no. Pt\_5, pp. 1600–1616, 2014, doi: 10.1099/ijs.0.059543-0.
- [24] J. Kim *et al.*, “Complete Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis of Helicobacter Apodemus Isolated From the Wild Korean Striped Field Mouse (Apodemus agrarius) for Potential Pathogenicity,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, 2018, Accessed: Feb. 15, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00838>
- [25] A. P. Moran, “The role of lipopolysaccharide in Helicobacter pylori pathogenesis,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 10 Suppl 1, pp. 39–50, Apr. 1996, doi: 10.1046/j.1365-2036.1996.22164004.x.
- [26] M. Isani *et al.*, “Lactobacillus murinus HF12 colonizes neonatal gut and protects rats from necrotizing enterocolitis,” *PLOS ONE*, vol. 13, no. 6, p. e0196710, Jun. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0196710.
- [27] S. M. Man, “Inflammasomes in the gastrointestinal tract: infection, cancer and gut microbiota homeostasis,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 15, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41575-018-0054-1.

- [28] H. Tye *et al.*, “NLRP1 restricts butyrate producing commensals to exacerbate inflammatory bowel disease,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Art. no. 1, Sep. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06125-0.
- [29] J. Yang *et al.*, “Sequence determinants of specific pattern-recognition of bacterial ligands by the NAIP–NLRC4 inflammasome,” *Cell Discov.*, vol. 4, p. 22, May 2018, doi: 10.1038/s41421-018-0018-1.
- [30] P. Menzel, K. L. Ng, and A. Krogh, “Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, Art. no. 1, Apr. 2016, doi: 10.1038/ncomms11257.
- [31] Y.-W. Wu, B. A. Simmons, and S. W. Singer, “MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 4, pp. 605–607, Feb. 2016, doi: 10.1093/bioinformatics/btv638.
- [32] M. Kanehisa, M. Furumichi, Y. Sato, M. Kawashima, and M. Ishiguro-Watanabe, “KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 51, no. D1, pp. D587–D592, Jan. 2023, doi: 10.1093/nar/gkac963.

#### **4. Conclusão**

De acordo com este estudo, o queijo experimental Emmental é considerado seguro para pessoas saudáveis e pode até aumentar a capacidade da microbiota de produzir metabólitos que têm propriedades de neuromodulação na regulação do eixo intestino- cérebro. No entanto, ainda há a necessidade de mais pesquisas para entender completamente o impacto dos queijos no sistema nervoso central e nas doenças neurodegenerativas. Além disso, os resultados sugerem que pode haver possíveis mecanismos antiinflamatórios relacionados à interação de bactérias comensais, como o *Lactobacillus murinus*, com o sistema imunológico no trato gastrointestinal.

## **5. Perspectivas**

- Investigar como os queijos funcionais experimentais afetam a comunidade de Fagos;
- Investigar como os efeitos dos queijos funcionais experimentais e modelo murino de esclerose múltipla.

## Referências

- Abubucker, Sahar, Nicola Segata, Johannes Goll, Alyxandria M. Schubert, Jacques Izard, Brandi L. Cantarel, Beltran Rodriguez-Mueller, Jeremy Zucker, Mathangi Thiagarajan, Bernard Henrissat, Owen White, Scott T. Kelley, Barbara Methé, Patrick D. Schloss, Dirk Gevers, Makedonka Mitreva, e Curtis Huttenhower. 2012. “Metabolic Reconstruction for Metagenomic Data and Its Application to the Human Microbiome”. *PLoS Computational Biology* 8(6):e1002358. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002358.
- Aburjaile, Flavia Figueira, Marine Rohmer, Hugues Parrinello, Marie-Bernadette Maillard, Eric Beaucher, Gwénaële Henry, Aurélie Nicolas, Marie-Noëlle Madec, Anne Thierry, Sandrine Parayre, Stéphanie-Marie Deutsch, Muriel Cocaign-Bousquet, Anderson Miyoshi, Vasco Azevedo, Yves Le Loir, e Hélène Falentin. 2016. “Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* to long-term survival under gradual nutritional shortage”. *BMC Genomics* 17(1):1007. doi: 10.1186/s12864-016-3367-x.
- Ahluwalia, Bani, Maria K. Magnusson, e Lena Öhman. 2017. “Mucosal Immune System of the Gastrointestinal Tract: Maintaining Balance between the Good and the Bad”. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 52(11):1185–93. doi: 10.1080/00365521.2017.1349173.
- Almeida, Alexandre, Stephen Nayfach, Miguel Boland, Francesco Strozzi, Martin Beracochea, Zhou Jason Shi, Katherine S. Pollard, Ekaterina Sakharova, Donovan H. Parks, Philip Hugenholtz, Nicola Segata, Nikos C. Kyrpides, e Robert D. Finn. 2021. “A Unified Catalog of 204,938 Reference Genomes from the Human Gut Microbiome”. *Nature Biotechnology* 39(1):105–14. doi: 10.1038/s41587-020-0603-3.
- Ananthakrishnan, Ashwin N. 2015. “Epidemiology and Risk Factors for IBD”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 12(4):205–17. doi: 10.1038/nrgastro.2015.34.
- Averina, Olga V., Yana A. Zorkina, Roman A. Yunes, Alexey S. Kovtun, Valeriya M. Ushakova, Anna Y. Morozova, George P. Kostyuk, Valery N. Danilenko, e Vladimir P. Chekhonin. 2020. “Bacterial Metabolites of Human Gut Microbiota Correlating with Depression”. *International Journal of Molecular Sciences* 21(23):9234. doi: 10.3390/ijms21239234.

- Boulangé, Claire L., Ana Luisa Neves, Julien Chilloux, Jeremy K. Nicholson, e Marc-Emmanuel Dumas. 2016. “Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease”. *Genome Medicine* 8(1):42. doi: 10.1186/s13073-016-0303-2.
- Cai, Zhaobei, Shu Wang, e Jiannan Li. 2021. “Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review”. *Frontiers in Medicine* 8.
- Carvalho, Rodrigo, Fillipe Carmo, Sara Heloisa, Barbara Cordeiro, Aline Vaz, Enrico Gimenez, Luis Goulart, Aristóteles Góes-Neto, Yves Le Loir, Gwénaél Jan, Vasco Azevedo, Rodrigo Carvalho, Fillipe Carmo, Sara Heloisa, Barbara Cordeiro, Aline Vaz, Enrico Gimenez, Luis Goulart, Aristóteles Góes-Neto, YvesLe Loir, Gwénaél Jan, e Vasco Azevedo. 2017. *Metagenomic Approaches for Investigating the Role of the Microbiome in Gut Health and Inflammatory Diseases*. IntechOpen.
- Carvalho, Rodrigo D. De Oliveira, Fillipe L. R. do Carmo, Alberto de Oliveira Junior, Philippe Langella, Jean-Marc Chatel, Luis G. Bermúdez-Humarán, Vasco Azevedo, e Marcela S. de Azevedo. 2017. “Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis”. *Frontiers in Microbiology* 8:800. doi: 10.3389/fmicb.2017.00800.
- Chatterton, Dereck E. W., Duc Ninh Nguyen, Stine Brandt Bering, e Per Torp Sangild. 2013. “Anti-Inflammatory Mechanisms of Bioactive Milk Proteins in the Intestine of Newborns”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(8):1730–47. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.028.
- Chen, Yijing, Jinying Xu, e Yu Chen. 2021. “Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders”. *Nutrients* 13(6):2099. doi: 10.3390/nu13062099.
- Davani-Davari, Dorna, Manica Negahdaripour, Iman Karimzadeh, Mostafa Seifan, Milad Mohkam, Seyed Jalil Masoumi, Aydin Berenjian, e Younes Ghasemi. 2019. “Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications”. *Foods* 8(3):92. doi: 10.3390/foods8030092.
- Dusko Ehrlich, S. e MetaHIT consortium. 2010. “[Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications]”. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* 34 Suppl 1:S23-28. doi: 10.1016/S0399-8320(10)70017-8.

- El Kafsi, Hela, Johan Binesse, Valentin Loux, Julien Buratti, Samira Boudebbouze, Rozenn Dervyn, Amal Hammani, Emmanuelle Maguin, e Maarten van de Guchte. 2014. “Genome Sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327, a Dairy Bacterium with Anti-Inflammatory Properties”. *Genome Announcements* 2(4):e00328-14. doi: 10.1128/genomeA.00328-14.
- Fan, Yong, e Oluf Pedersen. 2021. “Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease”. *Nature Reviews Microbiology* 19(1):55–71. doi: 10.1038/s41579-020-0433-9.
- Feeney, Shane, Joseph Thomas Ryan, Michelle Kilcoyne, Lokesh Joshi, e Rita Hickey. 2017. “Glycomacropptide Reduces Intestinal Epithelial Cell Barrier Dysfunction and Adhesion of Entero-Hemorrhagic and Entero-Pathogenic *Escherichia coli* in Vitro”. *Foods* 6(11):93. doi: 10.3390/foods6110093.
- Frioux, Clémence, Dipali Singh, Tamas Korcsmaros, e Falk Hildebrand. 2020. “From Bag-of-Genes to Bag-of-Genomes: Metabolic Modelling of Communities in the Era of Metagenome-Assembled Genomes”. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:1722–34. doi: 10.1016/j.csbj.2020.06.028.
- Gasmi, Amin, Aniqā Nasreen, Alain Menzel, Asma Gasmi Benahmed, Lyudmila Pivina, Sādaf Noor, Massimiliano Peana, Salvatore Chirumbolo, e Geir Bjørklund. 2023. “Neurotransmitters Regulation and Food Intake: The Role of Dietary Sources in Neurotransmission”. *Molecules* 28(1):210. doi: 10.3390/molecules28010210.
- Ghosh, Soma, e Sreemanta Pramanik. 2021. “Structural Diversity, Functional Aspects and Future Therapeutic Applications of Human Gut Microbiome”. *Archives of Microbiology* 203(9):5281–5308. doi: 10.1007/s00203-021-02516-y.
- Greenfield, S. M., N. A. Punchard, J. P. Teare, e R. P. Thompson. 1993. “Review Article: The Mode of Action of the Aminosalicylates in Inflammatory Bowel Disease”. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 7(4):369–83. doi: 10.1111/j.1365-2036.1993.tb00110.x.
- Hilton, Sarah K., Eduardo Castro-Nallar, Marcos Pérez-Losada, Ian Toma, Timothy A. McCaffrey, Eric P. Hoffman, Marc O. Siegel, Gary L. Simon, W. Evan Johnson, e Keith A. Crandall. 2016. “Metataxonomic and Metagenomic Approaches vs. Culture-Based Techniques for Clinical Pathology”. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Huang, Yi, Wen Xu, e Rongbin Zhou. 2021. “NLRP3 Inflammasome Activation and Cell Death”. *Cellular & Molecular Immunology* 18(9):2114–27. doi: 10.1038/s41423-021-00740-6.



- Junjua, Maira, Noura Kechaou, Florian Chain, Ahoefa Ablavi Awussi, Yvonne Roussel, Clarisse Perrin, Emeline Roux, Philippe Langella, Luis G. Bermúdez-Humarán, Yves Le Roux, Jean-Marc Chatel, e Annie Dary-Mourot. 2016. “A Large Scale in Vitro Screening of Streptococcus Thermophilus Strains Revealed Strains with a High Anti-Inflammatory Potential”. *LWT* 70:78–87. doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.006.
- Kim, Ji-Sun, Se Won Kang, Ju Huck Lee, Seung-Hwan Park, e Jung-Sook Lee. 2022. “The evolution and competitive strategies of Akkermansia muciniphila in gut”. *Gut Microbes* 14(1):2025017. doi: 10.1080/19490976.2021.2025017.
- Kobayashi, Nobuhide, Daisuke Takahashi, Shunsuke Takano, Shunsuke Kimura, e Koji Hase. 2019. “The Roles of Peyer’s Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases”. *Frontiers in Immunology* 10.
- Lerner, Aaron, Torsten Matthias, e Rustam Aminov. 2017. “Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut”. *Frontiers in Immunology* 8:1630. doi: 10.3389/fimmu.2017.01630.
- Li, Chang Cheng, Xin Yue Tang, Yi Bo Zhu, Ying Jie Song, Ning Lin Zhao, Qin Huang, Xing Yu Mou, Gui Hua Luo, Tong Gen Liu, Ai Ping Tong, Hong Tang, e Rui Bao. 2021. “Structural Analysis of the Sulfatase AmAS from Akkermansia Muciniphila”. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology* 77(Pt 12):1614–23. doi: 10.1107/S2059798321010317.
- Liu, Meng-Jie, Jing-Yu Yang, Zhen-Hua Yan, Shuang Hu, Jun-Qi Li, Zhi-Xiang Xu, e Yong-Ping Jian. 2022. “Recent Findings in Akkermansia Muciniphila-Regulated Metabolism and Its Role in Intestinal Diseases”. *Clinical Nutrition* 41(10):2333–44. doi: 10.1016/j.clnu.2022.08.029.
- Liu, Pinyi, Yanbing Wang, Ge Yang, Qihe Zhang, Lingbin Meng, Ying Xin, e Xin Jiang. 2021. “The Role of Short-Chain Fatty Acids in Intestinal Barrier Function, Inflammation, Oxidative Stress, and Colonic Carcinogenesis”. *Pharmacological Research* 165:105420. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105420.
- Magalhães, Henrique Inhauser Riceti, e Patricia Castelucci. 2021. “Enteric nervous system and inflammatory bowel diseases: Correlated impacts and therapeutic approaches through the P2X7 receptor”. *World Journal of Gastroenterology* 27(46):7909–24. doi: 10.3748/wjg.v27.i46.7909.

- Manichanh, Chaysavanh, Natalia Borrueal, Francesc Casellas, e Francisco Guarner. 2012. “The Gut Microbiota in IBD”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(10):599–608. doi: 10.1038/nrgastro.2012.152.
- Martino, Cameron, Amanda Hazel Dilmore, Zachary M. Burcham, Jessica L. Metcalf, Dilip Jeste, e Rob Knight. 2022. “Microbiota Succession throughout Life from the Cradle to the Grave”. *Nature Reviews Microbiology* 20(12):707–20. doi: 10.1038/s41579-022-00768-z.
- McNabney, Sean M., e Tara M. Henagan. 2017. “Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance”. *Nutrients* 9(12):1348. doi: 10.3390/nu9121348.
- Moreno, Lorena Ortega, Samuel Fernández-Tomé, e Raquel Abalo. 2021. “Biological Treatments in Inflammatory Bowel Disease: A Complex Mix of Mechanisms and Actions”. *Biologics* 1(2):189–210. doi: 10.3390/biologics1020012.
- Otaru, Nize, Kun Ye, Denisa Mujezinovic, Laura Berchtold, Florentin Constancias, Fabián A. Cornejo, Adam Krzystek, Tomas de Wouters, Christian Braegger, Christophe Lacroix, e Benoit Pugin. 2021. “GABA Production by Human Intestinal Bacteroides spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance”. *Frontiers in Microbiology* 12:656895. doi: 10.3389/fmicb.2021.656895.
- Pérez-Losada, Marcos, Dhatri Badri Narayanan, Allison R. Kolbe, Ignacio Ramos-Tapia, Eduardo Castro-Nallar, Keith A. Crandall, e Jorge Domínguez. 2022. “Comparative Analysis of Metagenomics and Metataxonomics for the Characterization of Vermicompost Microbiomes”. *Frontiers in Microbiology* 13:854423. doi: 10.3389/fmicb.2022.854423.
- Pruss, K. M., A. Marcobal, A. M. Southwick, D. Dahan, S. A. Smits, J. A. Ferreyra, S. K. Higginbottom, E. D. Sonnenburg, P. C. Kashyap, B. Choudhury, L. Bode, e J. L. Sonnenburg. 2021. “Mucin-Derived O-Glycans Supplemented to Diet Mitigate Diverse Microbiota Perturbations”. *The ISME Journal* 15(2):577–91. doi: 10.1038/s41396-020-00798-6.
- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, Nicolas Pons, Florence Levenez, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Junhua Li, Junming Xu, Shaochuan Li, Dongfang Li, Jianjun Cao, Bo Wang, Huiqing Liang, Huisong Zheng, Yinlong Xie, Julien Tap, Patricia Lepage, Marcelo Bertalan, Jean-Michel Batto, Torben

- Hansen, Denis Le Paslier, Allan Linneberg, H. Bjørn Nielsen, Eric Pelletier, Pierre Renault, Thomas Sicheritz-Ponten, Keith Turner, Hongmei Zhu, Chang Yu, Shengting Li, Min Jian, Yan Zhou, Yingrui Li, Xiuqing Zhang, Songgang Li, Nan Qin, Huanming Yang, Jian Wang, Søren Brunak, Joel Doré, Francisco Guarner, Karsten Kristiansen, Oluf Pedersen, Julian Parkhill, Jean Weissenbach, MetaHIT Consortium, Peer Bork, S. Dusko Ehrlich, e Jun Wang. 2010. “A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing”. *Nature* 464(7285):59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Rabah, Houem, Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Barbara Fernandes Cordeiro, Sara Heloisa da Silva, Emiliano Rosa Oliveira, Luisa Lemos, Denise Carmona Cara, Ana Maria Caetano Faria, Gilles Garric, Marielle Harel-Oger, Yves Le Loir, Vasco Azevedo, Guillaume Bouguen, e Gwénaél Jan. 2020. “Beneficial Propionibacteria within a Probiotic Emmental Cheese: Impact on Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis in Mice”. *Microorganisms* 8(3):380. doi: 10.3390/microorganisms8030380.
- Rabah, Houem, Fillipe Luiz Rosa do Carmo, e Gwénaél Jan. 2017. “Dairy Propionibacteria: Versatile Probiotics”. *Microorganisms* 5(2):24. doi: 10.3390/microorganisms5020024.
- Reboldi, Andrea, e Jason G. Cyster. 2016. “Peyer’s patches: Organizing B cell responses at the intestinal frontier”. *Immunological reviews* 271(1):230–45. doi: 10.1111/imr.12400.
- Rinninella, Emanuele, Pauline Raoul, Marco Cintoni, Francesco Franceschi, Giacinto Abele Donato Miggiano, Antonio Gasbarrini, e Maria Cristina Mele. 2019. “What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases”. *Microorganisms* 7(1):14. doi: 10.3390/microorganisms7010014.
- Santos Rocha, Clarissa, Ana Cristina Gomes-Santos, Thais Garcias Moreira, Marcela de Azevedo, Tessalia Diniz Luerce, Mahendra Mariadassou, Ana Paula Longaray Delamare, Philippe Langella, Emmanuelle Maguin, Vasco Azevedo, Ana Maria Caetano de Faria, Anderson Miyoshi, e Maarten van de Guchte. 2014. “Local and Systemic Immune Mechanisms Underlying the Anti-Colitis Effects of the Dairy Bacterium *Lactobacillus delbrueckii*”. *PLoS ONE* 9(1):e85923. doi: 10.1371/journal.pone.0085923.

- Sawin, Emily A., Travis J. De Wolfe, Busra Aktas, Bridget M. Stroup, Sangita G. Murali, James L. Steele, e Denise M. Ney. 2015. “Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice”. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309(7):G590–601. doi: 10.1152/ajpgi.00211.2015.
- Segal, Jonathan P., Benjamin H. Mullish, Mohammed Nabil Quraishi, Animesh Acharjee, Horace R. T. Williams, Tariq Iqbal, Ailsa L. Hart, e Julian R. Marchesi. 2019. “The Application of Omics Techniques to Understand the Role of the Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease”. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 12:1756284818822250. doi: 10.1177/1756284818822250.
- Shin, Dong Wook, e Beong Ou Lim. 2020. “Nutritional Interventions Using Functional Foods and Nutraceuticals to Improve Inflammatory Bowel Disease”. *Journal of Medicinal Food* 23(11):1136–45. doi: 10.1089/jmf.2020.4712.
- Syromyatnikov, Mikhail, Ekaterina Nesterova, Maria Gladkikh, Yuliya Smirnova, Mariya Gryaznova, e Vasily Popov. 2022. “Characteristics of the Gut Bacterial Composition in People of Different Nationalities and Religions”. *Microorganisms* 10(9):1866. doi: 10.3390/microorganisms10091866.
- Thursby, Elizabeth, e Nathalie Juge. 2017. “Introduction to the human gut microbiota”. *Biochemical Journal* 474(11):1823–36. doi: 10.1042/BCJ20160510.
- Tye, Hazel, Chien-Hsiung Yu, Lisa A. Simms, Marcel R. de Zoete, Man Lyang Kim, Martha Zakrzewski, Jocelyn S. Penington, Cassandra R. Harapas, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes, Leesa F. Wockner, Adele Preaudet, Lisa A. Mielke, Stephen A. Wilcox, Yasunori Ogura, Sinead C. Corr, Komal Kanojia, Konstantinos A. Kouremenos, David P. De Souza, Malcolm J. McConville, Richard A. Flavell, Motti Gerlic, Benjamin T. Kile, Anthony T. Papenfuss, Tracy L. Putoczki, Graham L. Radford-Smith, e Seth L. Masters. 2018. “NLRP1 Restricts Butyrate Producing Commensals to Exacerbate Inflammatory Bowel Disease”. *Nature Communications* 9(1):3728. doi: 10.1038/s41467-018-06125-0.
- Zaki, Hasan, Kelli L. Boyd, Michael B. Kastan, Mohamed Lamkanfi, e Thirumala-Devi Kanneganti. 2010. “The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis”. *Immunity* 32(3):379–91. doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.003.

- Zmora, Niv, Jotham Suez, e Eran Elinav. 2019. “You Are What You Eat: Diet, Health and the Gut Microbiota”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16(1):35–56. doi: 10.1038/s41575-018-0061-2.
- de Zoete, Marcel R., e Richard A. Flavell. 2013. “Interactions between Nod-Like Receptors and Intestinal Bacteria”. *Frontiers in Immunology* 4:462. doi: 10.3389/fimmu.2013.00462.

## Apêndices

### Apêndice A – Outras Produções científicas durante o curso de Doutorado

1. ANDRADE, MARIA EMÍLIA RABELO ; TRINDADE, LUISA MARTINS ; LEOCÁDIO, PAOLA CAROLINE LACERDA ; LEITE, JACQUELINE ISAURA ALVAREZ ; DOS REIS, DIEGO CARLOS ; CASSALI, GEOVANNI DANTAS ; DA SILVA, TALES FERNANDO ; DE OLIVEIRA CARVALHO, RODRIGO DIAS ; DE CARVALHO AZEVEDO, VASCO ARISTON ; CAVALCANTE, GREGÓRIO GRAMA ; DE OLIVEIRA, JAMIL SILVANO ; FERNANDES, SIMONE ODÍLIA ANTUNES ; GENEROSO, SIMONE VASCONCELOS ; CARDOSO, VALBERT NASCIMENTO . Association of Fructo-oligosaccharides and Arginine Improves Severity of Mucositis and Modulate the Intestinal Microbiota. Probiotics and Antimicrobial Proteins, v. 1, p. 1, 2023.

2. CARVALHO, D. S. ; UETANABARO, A. P. T. ; KATO, R. B. ; ABURJAILE, F. F. ; JAISWAL, A. K. ; PROFETA, R. ; CARVALHO, RODRIGO D. O. ; TIWARI, S. ; PINTO, ANNE CYBELLE ; COSTA, E. A. ; KUKHARENKO, O. ; ORLOVSKA, I. ; PODOLICH, O. ; REVA, O. ; RAMOS, P. I. P. ; AZEVEDO, V. ; BRENIG, B. ; ANDRADE, B. ; VERA, J. P. ; KOZYROVSKA, N. O. ; BARH, D. ; GOES-NETO, A. . Characterization of space-exposed kombucha microbial community member *K. oboediens* show no obvious changes in its genome after reactivation. Frontiers in Microbiology, v. 1, p. 1, 2022.

3. VALDEZ-BAEZ, J.; COSTA, F. M. R. ; GOMIDE, A. C. P. ; PROFETA, R. ; SILVA, A. L. ; SOUSA, T. J. ; VIANA, M. V. C. ; KATO, R. B. ; AMERICO, M. F. ; FREITAS, A. S. ; CARVALHO, RODRIGO ; BRENIG, B. ; MARTINS, F. S. ; ABURJAILE, F. ; AZEVEDO, V. . Comparative Genomics and In Silico Evaluation of Genes Related to the Probiotic Potential of *Bifidobacterium breve* 1101A. Bacteria, v. 1, p. 161-182, 2022.

4. CARVALHO, R. D. O.; GUEDON, E. ; ABURJAILE, F. ; AZEVEDO, V. . Editorial: Probiogenomics of classic and next-generation probiotics. Frontiers in Microbiology, v. 1, p. 1, 2022.

5. COELHO-ROCHA, N. D. ; JESUS, L. C. L. ; BARROSO, F. A. L. ; SILVA, T. F. ; FERREIRA, E. ; GONCALVES, J. E. ; MARTINS, F. S. ; CARVALHO, R. D. O. ; BARH, D. ; AZEVEDO, V. . Evaluation of Probiotic Properties of Novel Brazilian *Lactiplantibacillus plantarum* Strains. Probiotics and Antimicrobial Proteins, p. 1, 2022

6.LUCENA, LUCAS PONTES; ALBUQUERQUE, GÉSSYKA RODRIGUES ; SOUZA, ELINEIDE BARBOSA ; BENKO-ISEPPON, ANA MARIA ; CARVALHO, RODRIGO DIAS OLIVEIRA ; ABURJAILE, FLÁVIA FIGUEIRA ; GAMA, MARCO AURÉLIO SIQUEIRA . Infectivity of Viable but Non-Cultivable Cells of Pigmented and Nonpigmented *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* Strains Demonstrate the Need to Establish Indexing Protocols for Cashew Propagules. *Bacteria*, v. 1, p. 207-217, 2022.

7.PEREIRA, MYLENA RIBEIRO; MACHADO, LAIS CESCHINI ; DE OLIVEIRA CARVALHO, RODRIGO DIAS ; DE LIMA CAVALCANTI, THAISE YASMINE VASCONCELOS ; DA SILVA FILHO, GIVALDO BOM ; DE SOUSA LIMA, TELMA ; FONSECA, SILVIO MIGUEL CASTILLO ; DE ASSIS LEITE SOUZA, FRANCISCO ; DA LUZ WALLAU, GABRIEL ; DE SOUZA MENDONÇA, FÁBIO ; DE OLIVEIRA FRANCA, RAFAEL FREITAS . Identification of a Virulent Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Pigeons (*Columba livia*) in Northeastern Brazil Using Next-Generation Genome Sequencing. *Viruses-Basel*, v. 14, p. 1579, 2022.

8.ALMEIDA, M.; CANARIO, M. ; CERQUEIRA, J. C. ; ABURJAILE, F. F. ; ZAMYATNIN JR, A. A. ; AZEVEDO, V. ; CARVALHO, R. D. O. . Novel insights in Bacterial Vaginosis etiology through genomic approaches. *ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS (ONLINE)*, v. 93, p. 1, 2021.

9.CARVALHO, RODRIGO; ABURJAILE, FLAVIA; CANARIO, MARCUS; NASCIMENTO, ANDRÉA M. A.; CHARTONE-SOUZA, EDMAR ; DE JESUS, LUIS ; ZAMYATNIN, ANDREY A. ; BRENIG, BERTRAM ; BARH, DEBMALYA ; GHOSH, PREETAM ; GOES-NETO, ARISTOTELES ; FIGUEIREDO, HENRIQUE C. P. ; SOARES, SIOMAR ; RAMOS, ROMMEL ; PINTO, ANNE ; AZEVEDO, VASCO . Genomic Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* BH100 Sub-strains. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1, 2021.

10.ALMEIDA, M. O. ; CARVALHO, R. D. O. ; ABURJAILE, F. F. ; MIRANDA, F. M. ; CERQUEIRA, J. C. ; BRENIG, B. ; GHOSH, P. ; RAMOS, R. ; KATO, R. B. ; SOARES, S. C. ; SILVA, A. ; AZEVEDO, V. ; CANARIO, M. . Characterization of the first vaginal *Lactobacillus crispatus* genomes isolated in Brazil. *PeerJ*, v. 9, p. e11079, 2021.

11.BRITO, A. ; MACHADO, L. ; OIDTMAN, R. ; SICONELLI, M. ; QUAN, T. M. ; FAUVER, J. ; CARVALHO, R. D. O. ; DEZORDI, F. ; PEREIRA, M. ; CASTRO-

JORGE, L. ; MINTO, E. ; PASSOS, L. ; KALINICH, C. ; PETRONE, M. ; ALLEN, E. ; ESPANA, G. ; HUANG, A. ; CUMMINGS, D. ; BAELE, G. ; FRANCA, R. ; FONSECA, B. ; PERKINS, T. ; WALLAU, G. ; GRUBAUGH, N. . Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. *Nature Communications*, v. 12, p. 1, 2021.

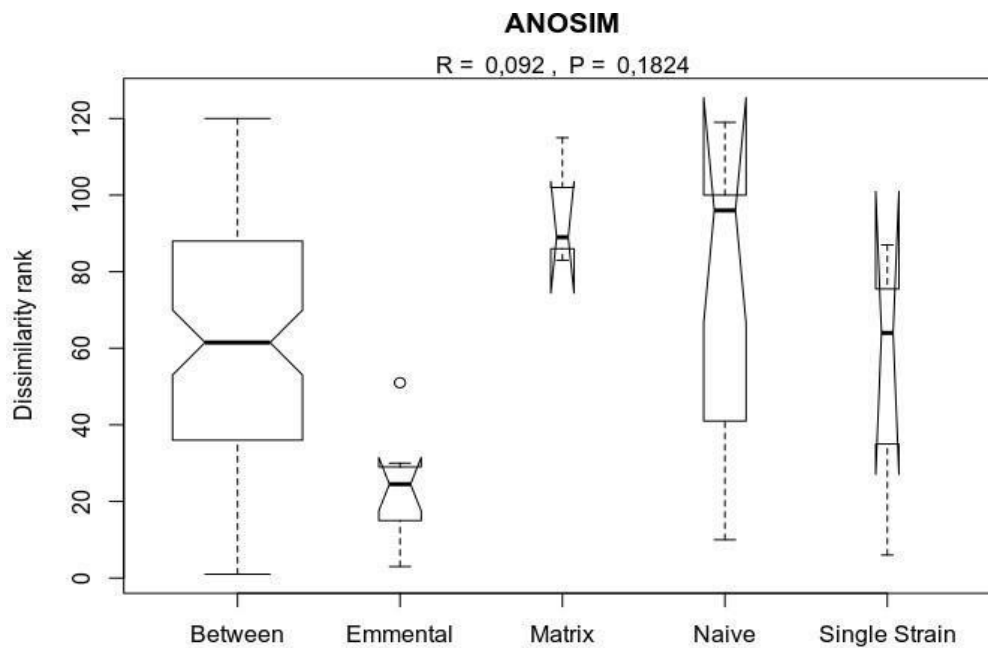
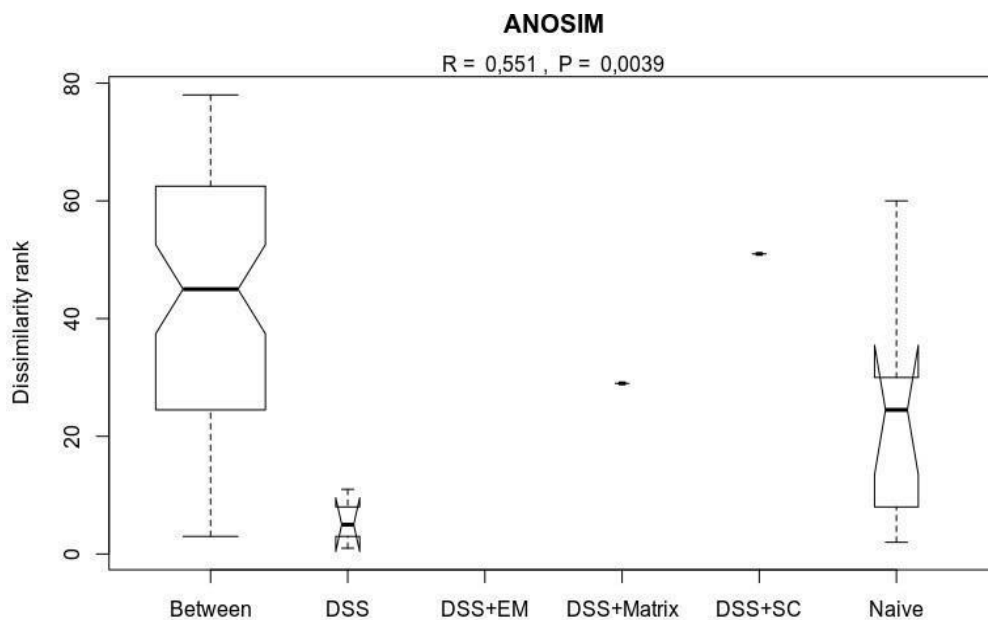
12.SILVA, A. F. ; DEZORDI, F. Z. ; MACHADO, L. C. ; CARVALHO, R. D. O. ; QIN, S. ; FAN, H. ; ZHANG, X. ; TONG, Y. ; SILVA, M. M. ; LORETO, E. L. S. ; WALLAU, G. L. . Metatranscriptomic analysis identifies different viral-like sequences in two neotropical *Mansoniini* mosquito species Corresponding author. *VIRUS RESEARCH*, v. 1, p. 1, 2021.

13.ABURJAILE, F. F.; VIANA, M. V. C. ; CERQUEIRA, J. C. ; DE JESUS, LUIS ; SILVA, T. F. ; CARVALHO, R. D. O. ; AZEVEDO, V. . Probiotic potential of novel Brazilian *Lactobacillus crispatus* strains. *GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH*, v. 1, p. 1, 2021.

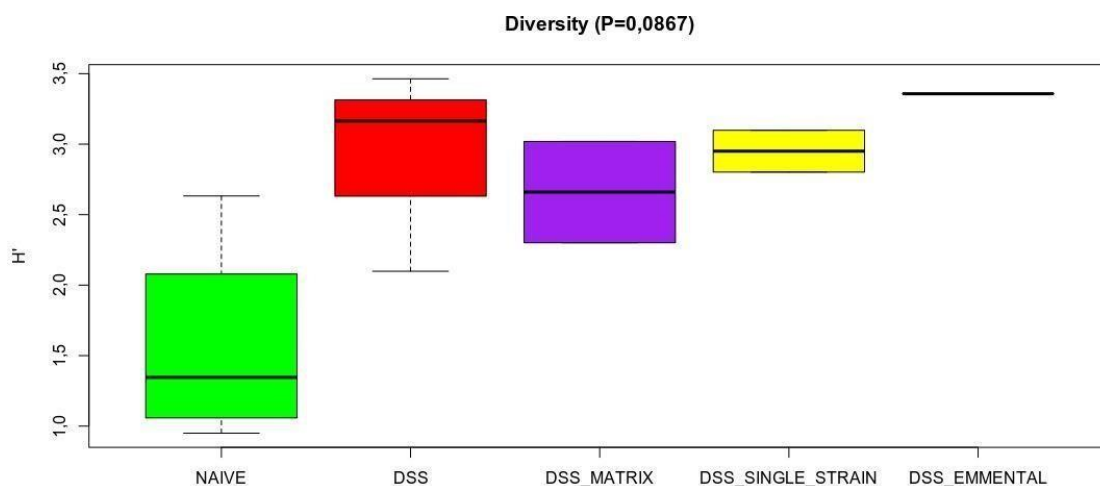


**Apêndice B – Material suplementar do artigo apresentado no Capítulo I****Tabelas disponíveis em:**

<https://drive.google.com/drive/folders/19jPV1KMFnGtyLvJDNjdAmhodE6ikW4kn?usp=sharing> (acesso 27/02/2023)

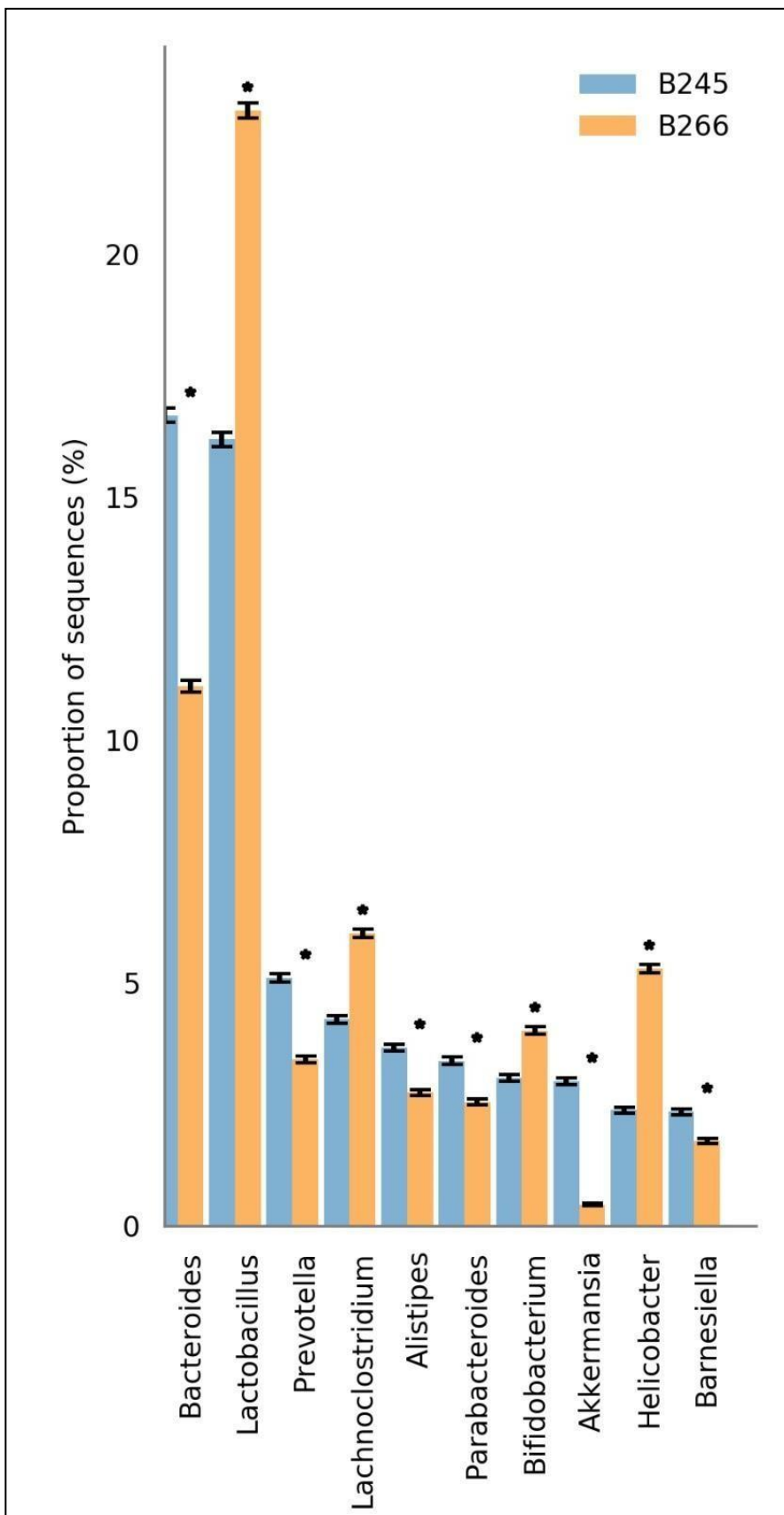
**A****B**

**Figure S1. Analysis of similarities (ANOSIM) of number of genes in each KEEG pathway among the groups.** Dissimilarity rank based on Bray-Curtis distance estimated for health mice samples in (A) and mice with colitis in (B). White circles in the graph represent outliers. R value is a ratio of the between groups variation to the within group variation. Statistical significance when P-value < 0.05.

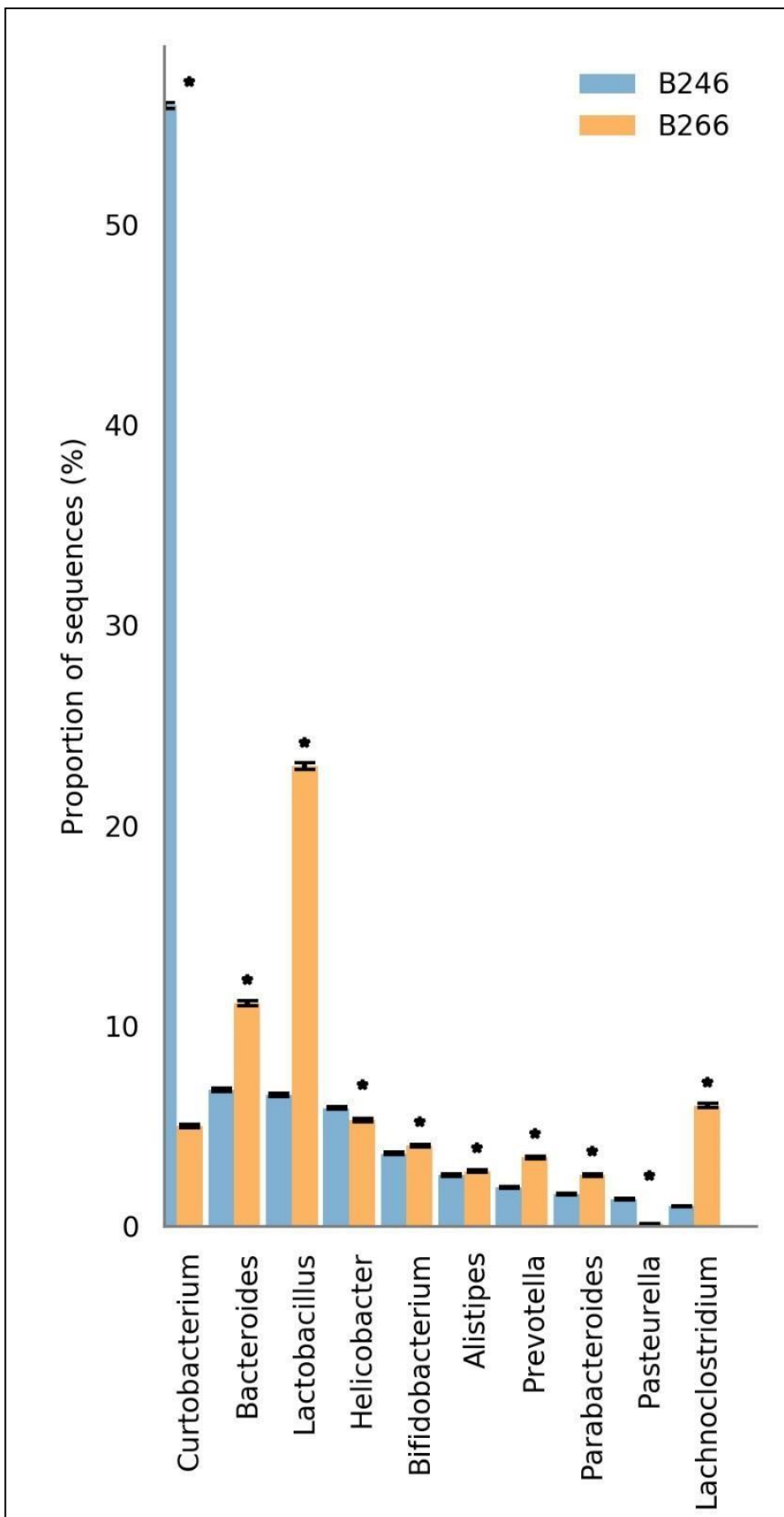


**Figure S2. Beta-diversity analysis of microbiome in mice with colitis treated with cheeses.** Beta-diversity analysis based on Shannon index ( $H'$ ). The line inside the box plot represents the median of  $H'$ . The length of the whiskers represents 1,5 times the inter-quartile range ( $H' \pm IQR \times 1.5$ ). White circles in the graph represent outliers ( $>1,5 \times IQR$ ). One-way ANOVA followed by Tukey Pos hoc test. No statistical significance, P-value > 0.05. The line inside the box plot represents the median of Shannon index ( $H'$ ). The length of the whiskers represents 1,5 times the inter-quartile range ( $H' \pm IQR \times 1.5$ ). White circles in the graph represent outliers ( $>1,5 \times IQR$ ). One-way ANOVA followed by Tukey Pos hoc test. No statistical significance, P-value > 0.05.

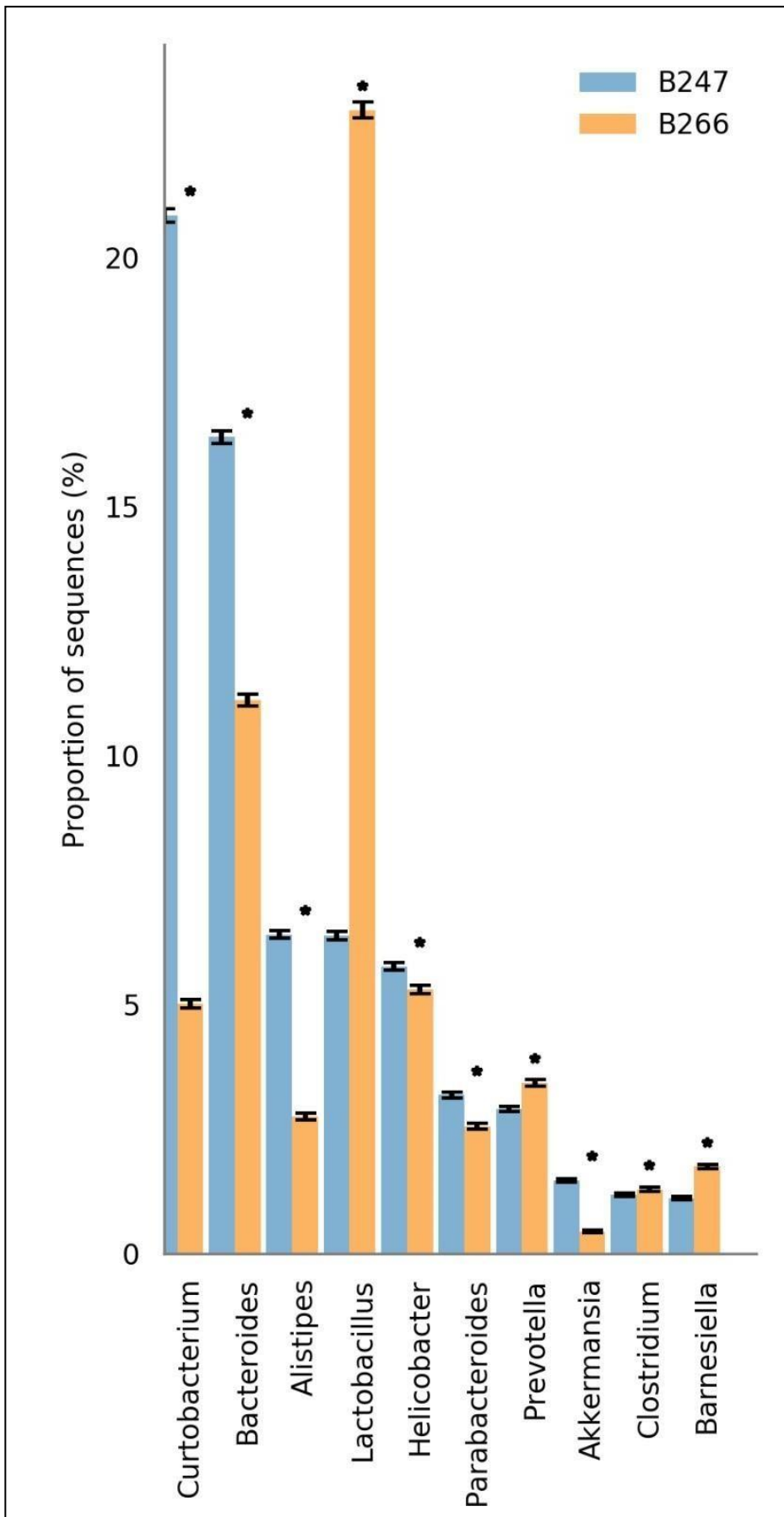
A



B

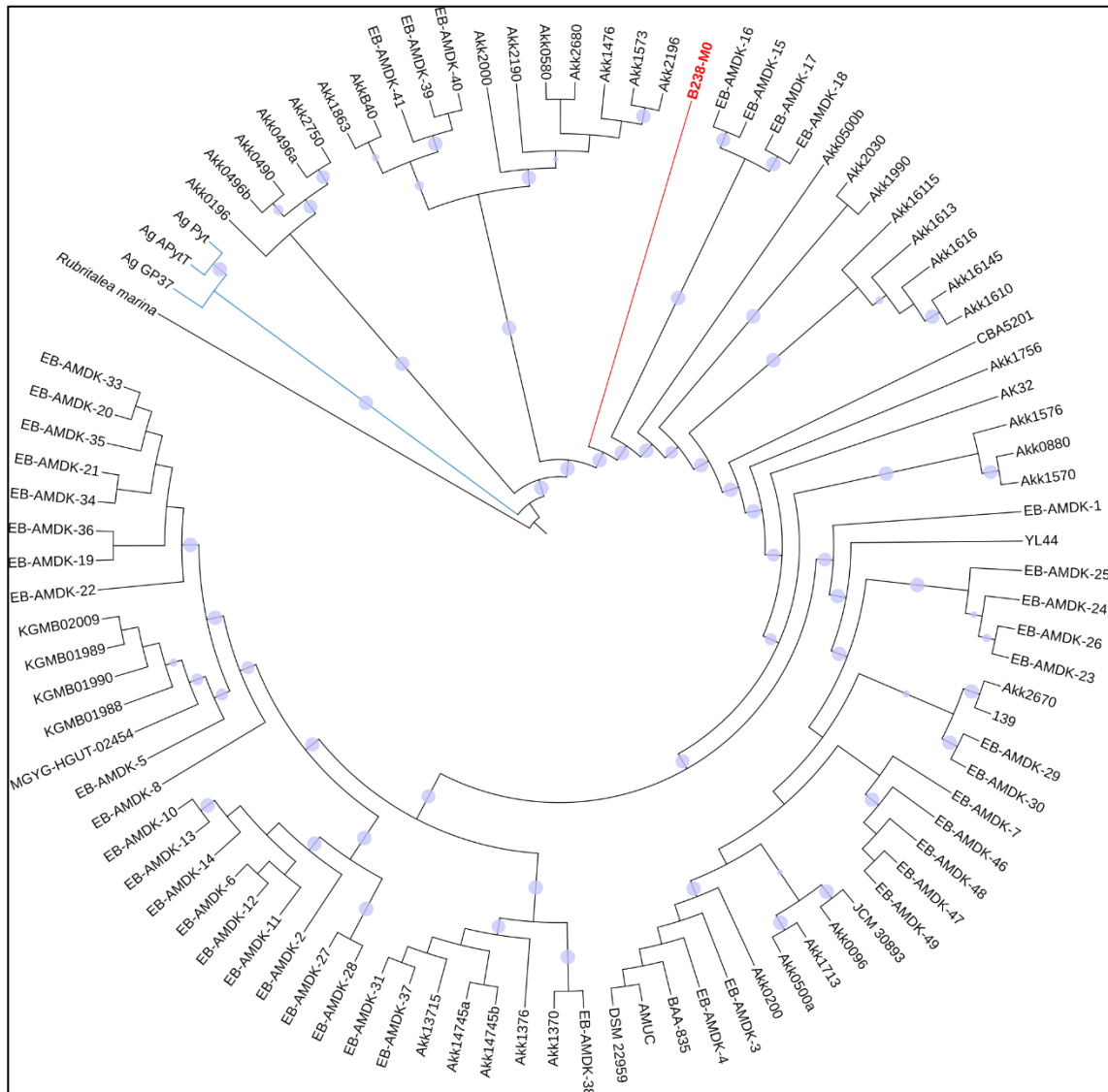


C

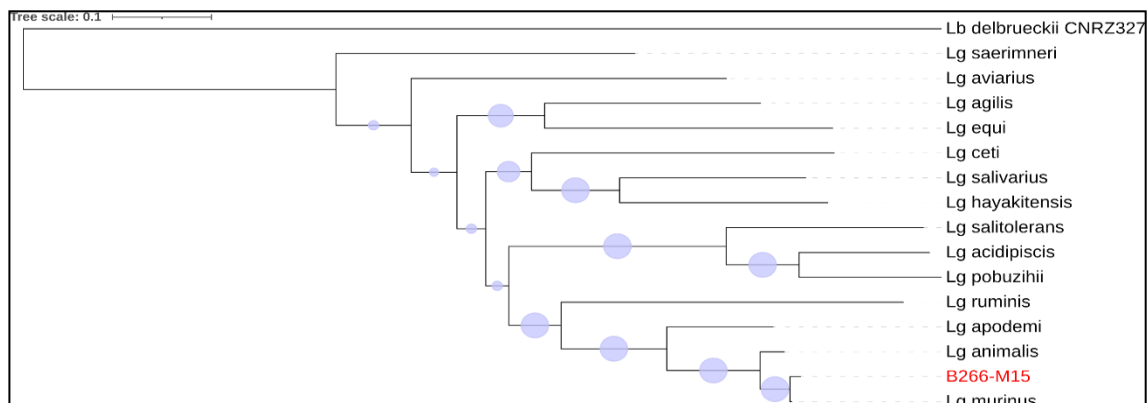


**Figure S3. Microbiome taxonomy profile in mice with colitis treated with the Emmental cheese.** Barplot of bacterial taxonomy showing the relative abundance between samples from DSS group and one sample from the DSS+Emmental group as follows: B245 (DSS) and B266 (DSS+Emmental) in (A); B246 (DSS) and B266 (DSS+Emmental) in (B); B247 (DSS) and B266 (DSS+Emmental) in (C). Chi-square test. Statistical significance when P-value > 0,05.

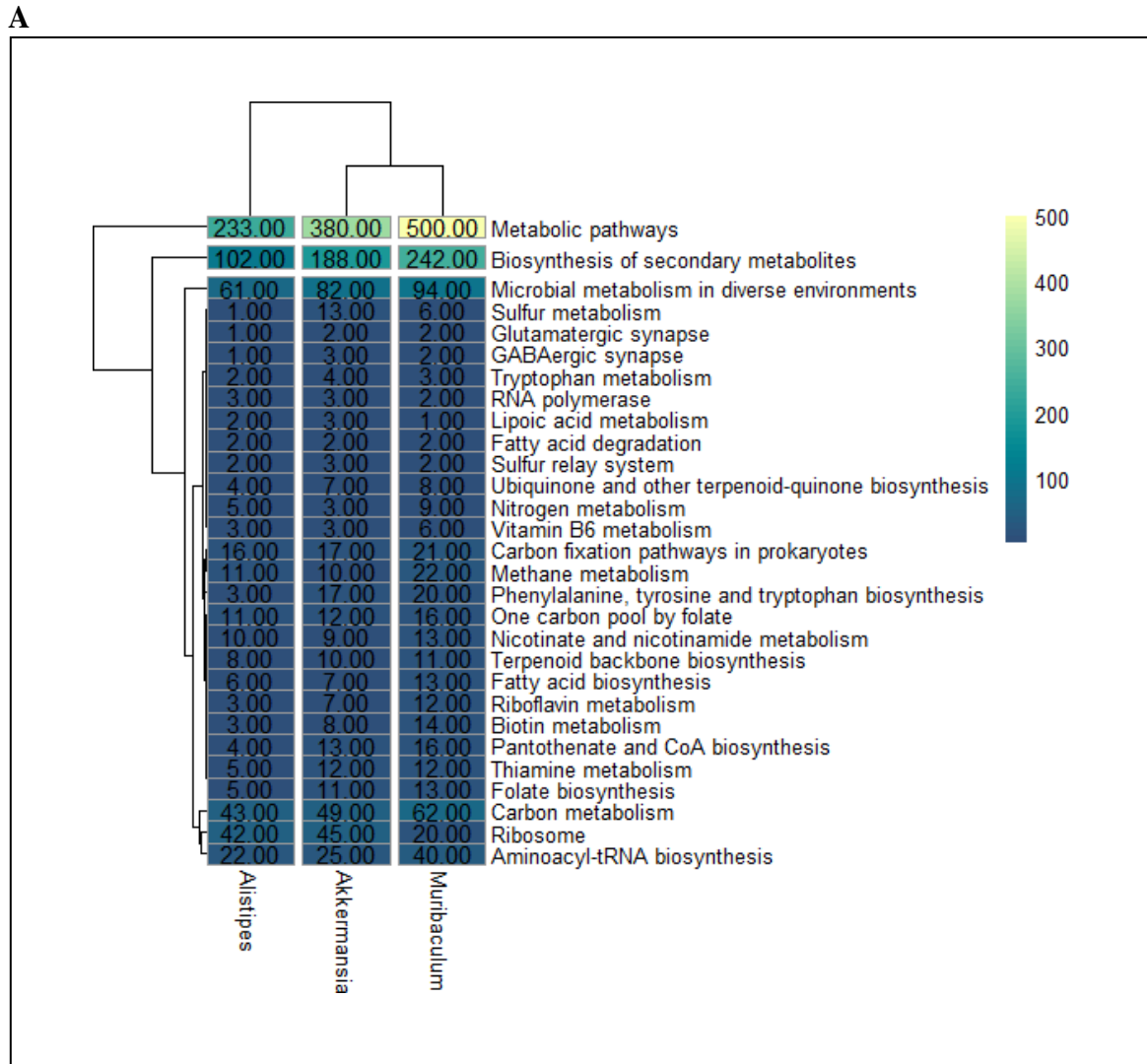
**A**



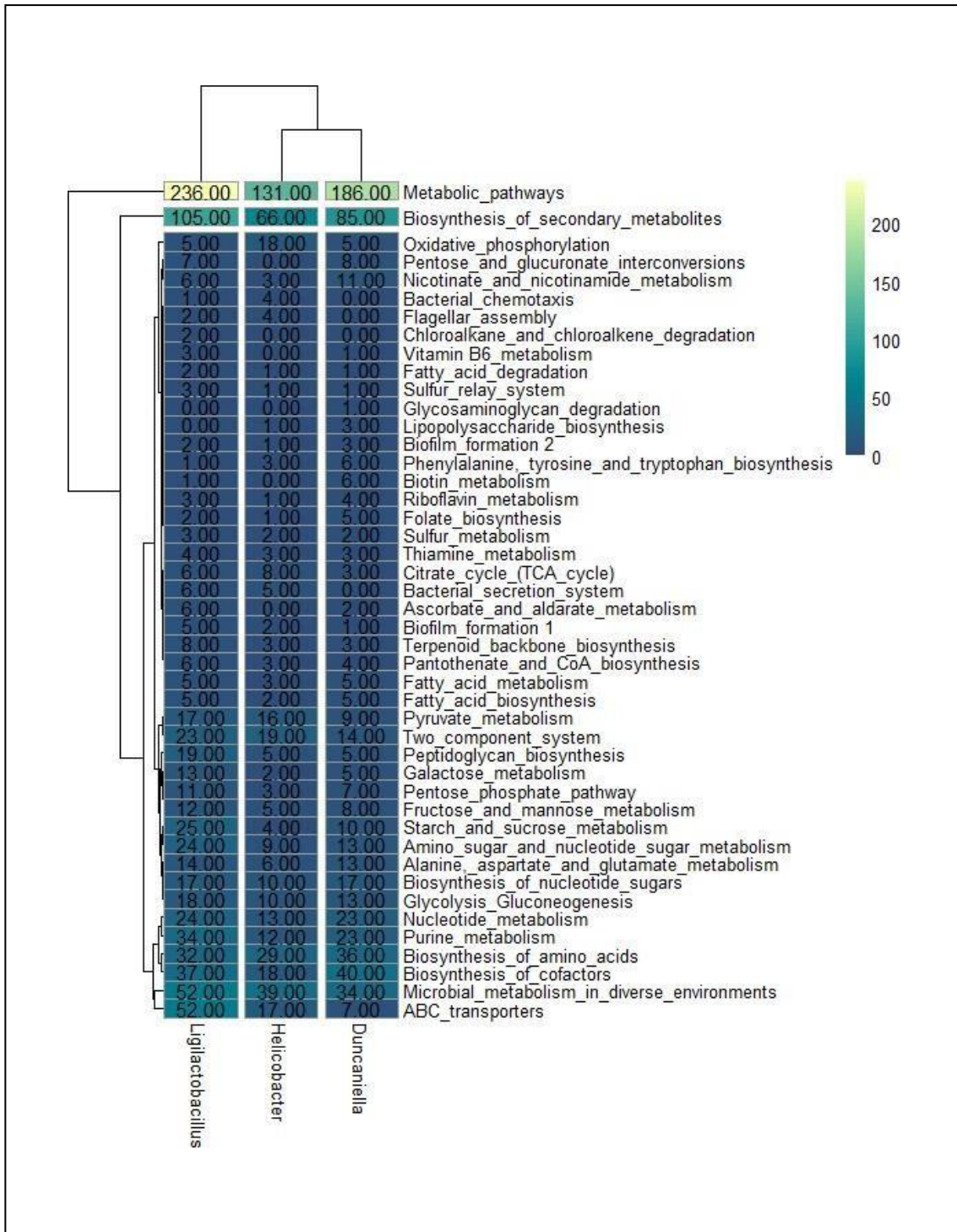
**B**



**Figure S4. Maximum likelihood phylogenetic tree of selected MAGs.** (A) MAG0 from Emmental group (sample B238) and a dataset of 95 *Akkermansia muciniphila* strains and three *A. glycaniphila* strains from GenBank (NCBI). *Rubritalea marina* was used as an outgroup. (B) Maximum likelihood phylogenetic tree of MAG15 reconstructed from DSS+Emmental group (sample B266) and 14 species from *Ligilactobacillus* genus from GenBank (NCBI). *Lb. delbruekii* CNRZ327 was used as an outgroup. The trees represents concatenated sequences of 92 bacterial orthologous gens. Bootstrap support values between 85 and 100 are represented by blue circles below the branches.



B



**Figure S5. Heatmap plot showing the individual taxa contribution analysis.** Data in the graph represents the number of genes per KEGG pathway estimated for recovered Metagenomes-assembled Genomes (MAG) in one sample from the Emmental group (A) and DSS+Emmental group (B). Dendrogram represents a hierarchical clustering based on UPGMA method.

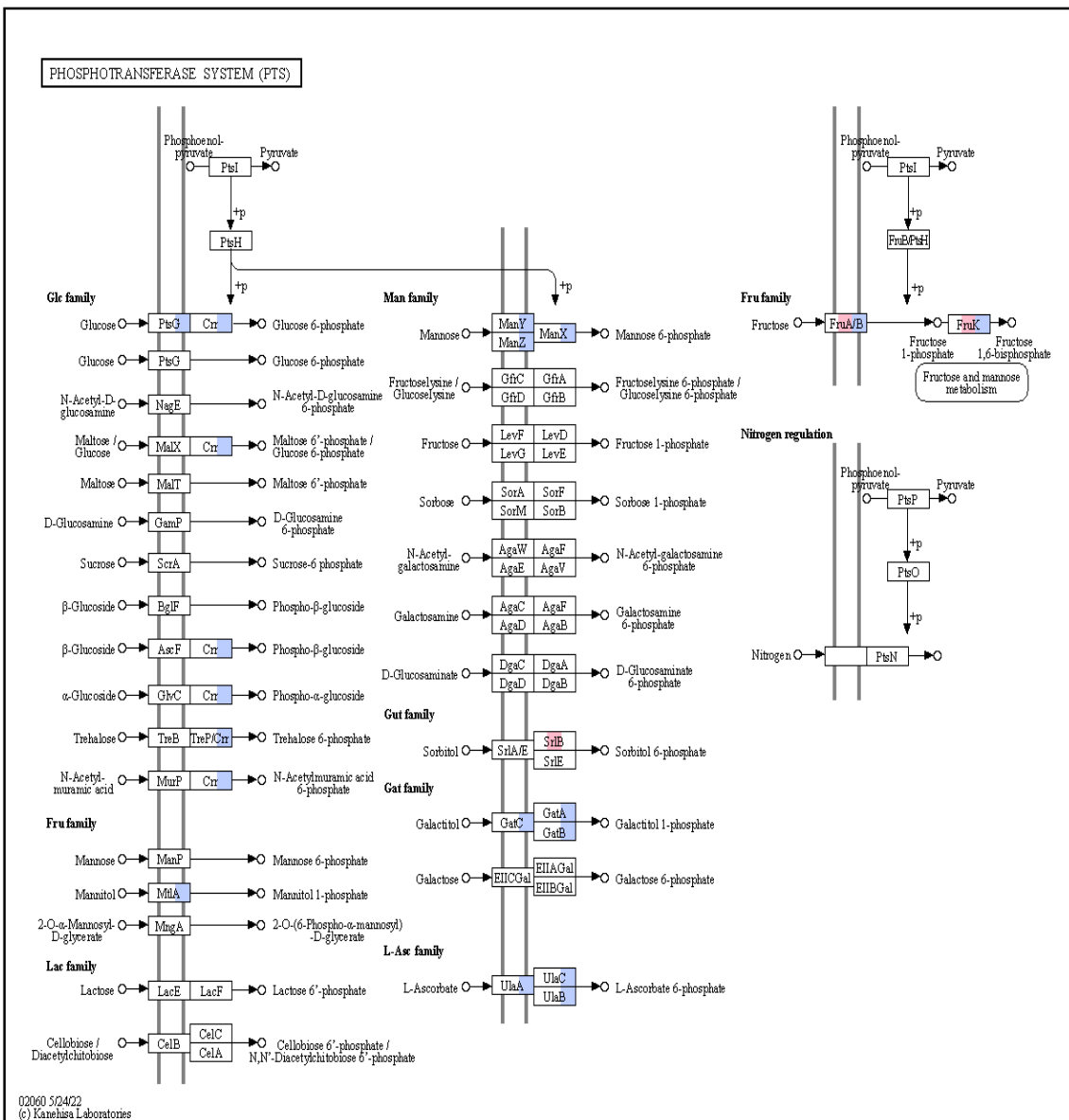


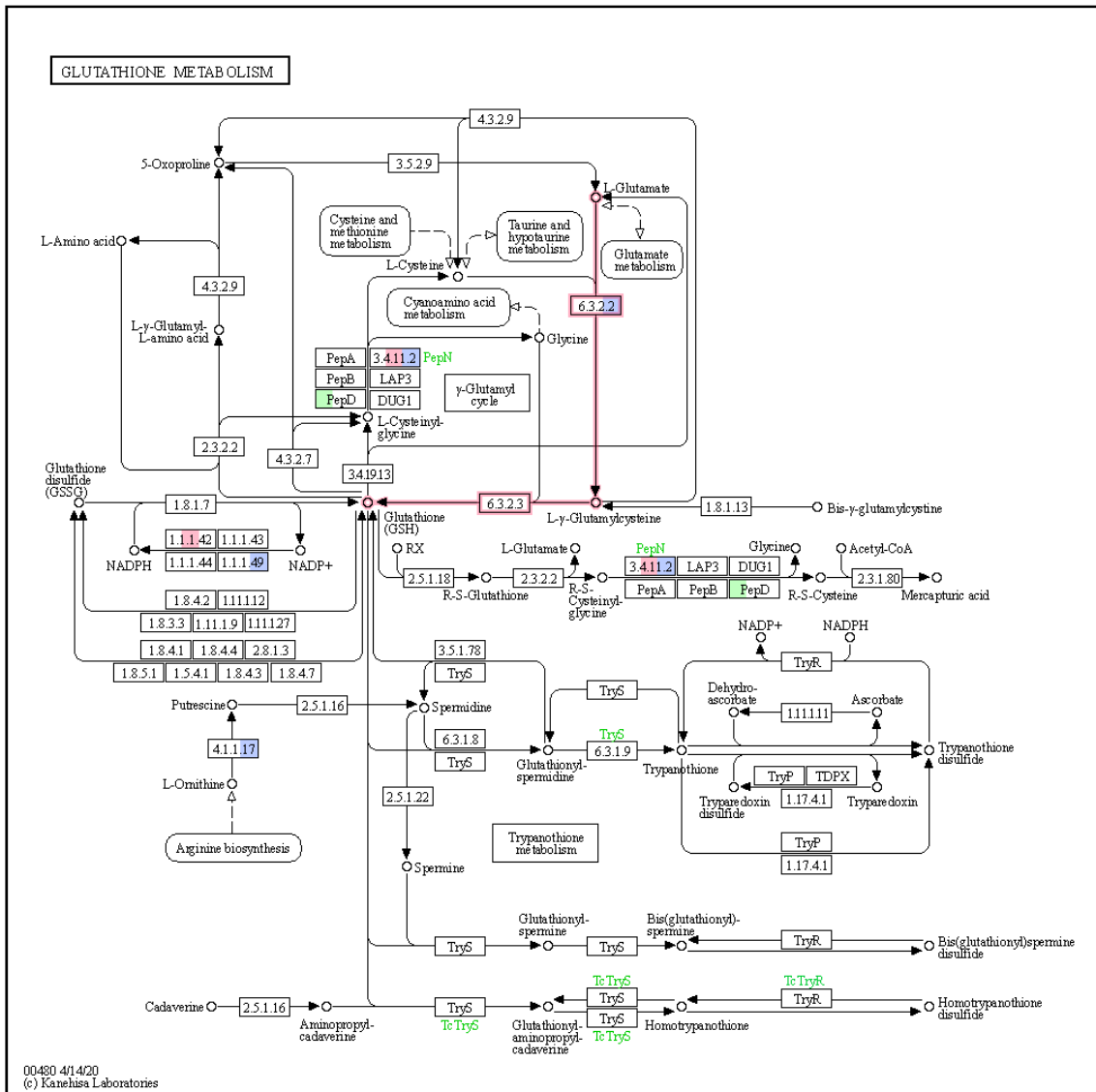






ABC TRANSPORTERS		
<b>Prokaryotic-type ABC transporters</b>		
<b>Mineral and organic ion transporters</b>		
Sulfate / Thiosulfate O	CysP CysW	CysA
Tungstate	TunA TunB TunC	
Molybdate / Tungstate O	WtpA WtpB WtpC	
Nitrate / Nitrite / Cyanate O	NtrA NtrB NtrC NtrD	
Bicarbonate O	CncA CncB CncC CncD	
Thiourea O	ThaA ThaC ThaB	
Albansulfonate O	SsaA SsaC SsaB	
HMP / FABIP O	ThyA ThyX ThyZ	
Phthalate O	OphF OphG OphH	
Molybdate O	ModA ModB ModF	
Iron (III) O	AfaA AfaB AfaC	
Thiamin O	ThaP ThaQ	
Spermidine / Putrescine O	PutD PutB PutA	
Putrescine O	Put PutH PutG	
Mannopeptide O	AmC AmA AmB	
2-Aminoethylphosphonate O	PhaS PhaU PhaT	
Glycine betaine / Proline O	ProX ProW ProV	
Osmoprotectant O	OpuAC OpuAB OpuBA	
<b>Oligosaccharide, polyol and lipid transporters</b>		
Maltose / Maltodextrin O	MaiF MaiG MaiK	
Galactose oligomer / Maltotriose/oligosaccharide O	GanO GanP GanQ MamX	
Raffinose/Stachyose/Melibiose O	MmeB MmeF MmeG MmeK	
Lactose $\beta$ -Lactosamine O	LacC LacF LacD	
Sorbitol / Mannitol O	SmoE SmoF SmoG SmoK	
$\alpha$ -Glucoside O	AgfE AgfF AgfK	
Oligosaccharonate O	TopB TopM TopA	
$\alpha$ -1,4-Digalacturonate O	AgfE AgfF AgfG	
Alkuronate O	LigA LigC	
Trehalose / Maltose O	ThaF ThaG ThaK	
Trehalose O	TrtT TrtU TrtV	
N-Acetylglucosamine O	NgcF NgcG	
Cellobiose O	CebF CebG MakK	
Chitobiose O	DcaA DcaB DcaC MakK	
Chitinose O	ChfA ChfB ChfG	
Aminopolysaccharide O	AniA AniF AniG MamX	
Xylobiose O	BxiE BxiF BxiG	
Sugar O	YnfF YnfD YnfE	
Multiple sugar O	MdcC MdcB MdcF	
Phospholipid O	MdbA MdbB MdbF	
<b>Monosaccharide transporters</b>		
Glucose / Arabinose O	GlcK GlcT GlcV	
Glucose / Mannose O	GtaA GtaB GtaC MakK	
Ribose / Autoinducer 2 / D-Xylose O	RbsB RbsC RbsA Auxiliary component RbsD	
L-Arabinose O	AnrF AnrH AnrG	
Galactofuranose O	YnfQ YnfT YnfR	
Methyl-galactoside O	MglB MglC MglA	
D-Xylose O	XylF XylH XylG	
D-Allose O	AlaB AlaC AlaA	
Fructose O	FrcB FrcC FrcA	
Rhamnose O	RhaC RhaP RhaQ RhaT	
Erythritol O	EryG EryF EryE	
Xyditol O	XitC XitB XitA	
myo-Inositol O	ItpA ItpF ItpA	
myo-Inositol 1-phosphate O	InoE InoF InoG	
Glycerol O	GlyP GlyF GlyQ GlyT	
sn-Glycerol 3-phosphate O	UgrB UgrA UgrC	
<b>Phosphate and amino acid transporters</b>		
Phosphate O	PhsA PhsB PhsC	
Phosphonate O	PhaD PhaE PhaC	
Lysine / Arginine / Ornithine O	ArgT ArgC ArgP	
Histidine O	HsdA HsdC HsdP	
Glutamine O	GlnH GlnP GlnQ	
Aspartate / Glutamate O	AspA AspB AspC	
Arginine O	ArgT ArgC ArgP	
Glutamate / Aspartate O	GlnH GlnC GlnP	
Octopine / Nopaline O	OcpT OcpM OcpC	
General L-Amino acid O	AspA AspM AspP	
Glutamate O	GlnH GlnC GlnA	
Cysteine O	CysA CysB CysC	
Cysteine O	CysY CysK CysM CysN	
S-Methylcysteine O	YxeM YxeN YxeO	
Arginine / Ornithine O	ArgT ArgC ArgP	
Arginine / Lysine / Histidine / Glutamate O	BgtB BgtA	
Arginine / Lysine / Histidine O	ArgT ArgC ArgR	
Lysine O	LysX LysY LysZ	
Lysine / Arginine / Ornithine / Octopine O	PA5123 PA5124 PA5125	
Hydroxyproline O	LhpP LhpM LhpN	
Branched-chain amino acid O	LivX LivH LivG LivV	
Neutral amino acid / Histidine O	NatB NatC NatA NatE	
D-Methionine O	MetC MetD MetN	
Urea O	UrbB UrbD UrbE	
<b>Peptide and nikel transporters</b>		
Oligopeptide O	OprA OprB OprC	
Dipeptide / Peptide / $\beta$ -Alanilolyl-valine acid O	DppA DppB DppC DppF	
Dipeptide O	DppE DppD	
Defensin O	DEFB SapA SapB SapC SapE	
Nikel O	NikA NikB NikC NikE	
Glutathione O	GatB GatD GatA	
Micromin C O	YnfA YnfE YnfF	
<b>Metallic cation, iron-sulfophore and vitamin B12 transporters</b>		
Fer(III) dicitrate O	FecB FecC FecD FecE	
Ferrioxalate O	FerB FerD FerC	
Fer(III) hydroxamate O	PhaD PhaB PhaC	
Vitamin B12 O	BthF BthC BthD	
Manganese O	MntC MntB MntA	
Manganese O	MntC MntB MntA	
Zinc O	ZnaA ZnaB ZnaC	
Iron (II, III) / Copper / Manganese / Zinc O	MntA MntC MntB	
Iron (II) / Manganese O	SitA SitC SitB	
Manganese / Zinc O	PnaA PnaC PnaB	
Zinc / Manganese / Iron (II) O	TroA TroC TroD TroB	
Cobalt O	CobN CobM CobP CobQ	
Nikel O	NikB NikM NikD CobQ	
Biotin O	BioY BioX BioM	
Biotin O	BioY BioT BioA BioZ	
Autoinducer 2 O	LstB LstD LstA	
Fibrolin O	RfaA RfaC RfaD RfaB	
<b>ABC 2 and other transporters</b>		
Hemolysin	CytB CytA	
Capillary polysaccharide	KpsB KpsM KpsT	
Capillary polysaccharide (Vincigenin)	VraB VraD VraC	
Lipopolysaccharide O	RfaA RfaB	
Trehalose acid O	TshG TshH	
Lipo-oligosaccharide O	NodJ NodI	
Na <sup>+</sup> O	NutB NutA	
Hemine O	HrbB HrbA	
Oleandomycin O	OleC2 OleC4	
Bacitracin O	BacB BacA	
Bacitracin O	BacB BacA	
Laanibiotin O	NutB NucD NucF	
Laanibiotin O	NutB NucD NucF	
Lipoprotein O	LolC LolE LolD	
Heme O	CcmD CcmC CcmA	
Lipopolysaccharide O	LptE LptD	
Fluoroquinolones O	Bv2686 Bv2687 Bv2688	
YyIF peptide	YyU YyI	
<b>ABC 2-type components without transporting function</b>		
Bacitracin O	BacE BacD	Bacitracin resistance
Cationic antimicrobial peptide (CAMP) O	Vag9 VagF	CAMP resistance
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> processing for NAD <sup>+</sup> reduction	NoyY NoyF	
Cellular division involvement	YnfX YnfE	
Acetoin utilization	YnfB YnfD YnfE	
<b>Eukaryotic-type ABC transporters</b>		
<b>ABCA Subfamily</b>		
ABCA1	ABCA2	ABCA3
ABCA4	ABCA5	ABCA6
ABCA7	ABCA8	ABCA9
ABCA10	ABCA11	ABCA12
<b>ABCB Subfamily</b>		
ABCB1	ABCB2	ABCB3
ABCB4	ABCB5	ABCB6
ABCB7	ABCB8	ABCB9
ABCB10	ABCB11	ABCB12
ABCB13	ABCB14	ABCB15
ABCB16	ABCB17	ABCB18
ABCB19	ABCB20	ABCB21
ABCB22	ABCB23	ABCB24
ABCB25	ABCB26	ABCB27
ABCB28	ABCB29	ABCB30
ABCB31	ABCB32	ABCB33
ABCB34	ABCB35	ABCB36
ABCB37	ABCB38	ABCB39
ABCB40	ABCB41	ABCB42
ABCB43	ABCB44	ABCB45
ABCB46	ABCB47	ABCB48
ABCB49	ABCB50	ABCB51
ABCB52	ABCB53	ABCB54
ABCB55	ABCB56	ABCB57
ABCB58	ABCB59	ABCB60
ABCB61	ABCB62	ABCB63
ABCB64	ABCB65	ABCB66
ABCB67	ABCB68	ABCB69
ABCB70	ABCB71	ABCB72
ABCB73	ABCB74	ABCB75
ABCB76	ABCB77	ABCB78
ABCB79	ABCB80	ABCB81
ABCB82	ABCB83	ABCB84
ABCB85	ABCB86	ABCB87
ABCB88	ABCB89	ABCB90
ABCB91	ABCB92	ABCB93
ABCB94	ABCB95	ABCB96
ABCB97	ABCB98	ABCB99
ABCB100	ABCB101	ABCB102
ABCB103	ABCB104	ABCB105
ABCB106	ABCB107	ABCB108
ABCB109	ABCB110	ABCB111
ABCB112	ABCB113	ABCB114
ABCB115	ABCB116	ABCB117
ABCB118	ABCB119	ABCB120
ABCB121	ABCB122	ABCB123
ABCB124	ABCB125	ABCB126
ABCB127	ABCB128	ABCB129
ABCB130	ABCB131	ABCB132
ABCB133	ABCB134	ABCB135
ABCB136	ABCB137	ABCB138
ABCB139	ABCB140	ABCB141
ABCB142	ABCB143	ABCB144
ABCB145	ABCB146	ABCB147
ABCB148	ABCB149	ABCB150
ABCB151	ABCB152	ABCB153
ABCB154	ABCB155	ABCB156
ABCB157	ABCB158	ABCB159
ABCB160	ABCB161	ABCB162
ABCB163	ABCB164	ABCB165
ABCB166	ABCB167	ABCB168
ABCB169	ABCB170	ABCB171
ABCB172	ABCB173	ABCB174
ABCB175	ABCB176	ABCB177
ABCB178	ABCB179	ABCB180
ABCB181	ABCB182	ABCB183
ABCB184	ABCB185	ABCB186
ABCB187	ABCB188	ABCB189
ABCB190	ABCB191	ABCB192
ABCB193	ABCB194	ABCB195
ABCB196	ABCB197	ABCB198
ABCB199	ABCB200	ABCB201
ABCB202	ABCB203	ABCB204
ABCB205	ABCB206	ABCB207
ABCB208	ABCB209	ABCB210
ABCB211	ABCB212	ABCB213
ABCB214	ABCB215	ABCB216
ABCB217	ABCB218	ABCB219
ABCB220	ABCB221	ABCB222
ABCB223	ABCB224	ABCB225
ABCB226	ABCB227	ABCB228
ABCB229	ABCB230	ABCB231
ABCB232	ABCB233	ABCB234
ABCB235	ABCB236	ABCB237
ABCB238	ABCB239	ABCB240
ABCB241	ABCB242	ABCB243
ABCB244	ABCB245	ABCB246
ABCB247	ABCB248	ABCB249
ABCB250	ABCB251	ABCB252
ABCB253	ABCB254	ABCB255
ABCB256	ABCB257	ABCB258
ABCB259	ABCB260	ABCB261
ABCB262	ABCB263	ABCB264
ABCB265	ABCB266	ABCB267
ABCB268	ABCB269	ABCB270
ABCB271	ABCB272	ABCB273
ABCB274	ABCB275	ABCB276
ABCB277	ABCB278	ABCB279
ABCB280	ABCB281	ABCB282
ABCB283	ABCB284	ABCB285
ABCB286	ABCB287	ABCB288
ABCB289	ABCB290	ABCB291
ABCB292	ABCB293	ABCB294
ABCB295	ABCB296	ABCB297
ABCB298	ABCB299	ABCB300
ABCB301	ABCB302	ABCB303
ABCB304	ABCB305	ABCB306
ABCB307	ABCB308	ABCB309
ABCB310	ABCB311	ABCB312
ABCB313	ABCB314	ABCB315
ABCB316	ABCB317	ABCB318
ABCB319	ABCB320	ABCB321
ABCB322	ABCB323	ABCB324
ABCB325	ABCB326	ABCB327
ABCB328	ABCB329	ABCB330
ABCB331	ABCB332	ABCB333
ABCB334	ABCB335	ABCB336
ABCB337	ABCB338	ABCB339
ABCB340	ABCB341	ABCB342
ABCB343	ABCB344	ABCB345
ABCB346	ABCB347	ABCB348
ABCB349	ABCB350	ABCB351
ABCB352	ABCB353	ABCB354
ABCB355	ABCB356	ABCB357
ABCB358	ABCB359	ABCB360
ABCB361	ABCB362	ABCB363
ABCB364	ABCB365	ABCB366
ABCB367	ABCB368	ABCB369
ABCB370	ABCB371	ABCB372
ABCB373	ABCB374	ABCB375
ABCB376	ABCB377	ABCB378
ABCB379	ABCB380	ABCB381
ABCB382	ABCB383	ABCB384
ABCB385	ABCB386	ABCB387
ABCB388	ABCB389	ABCB390
ABCB391	ABCB392	ABCB393
ABCB394	ABCB395	ABCB396
ABCB397	ABCB398	ABCB399
ABCB400	ABCB401	ABCB402
ABCB403	ABCB404	ABCB405
ABCB406	ABCB407	ABCB408
ABCB409	ABCB410	ABCB411
ABCB412	ABCB413	ABCB414
ABCB415	ABCB416	ABCB417
ABCB418	ABCB419	ABCB420
ABCB421	ABCB422	ABCB423
ABCB424	ABCB425	ABCB426
ABCB427	ABCB428	ABCB429
ABCB430	ABCB431	ABCB432
ABCB433	ABCB434	ABCB435
ABCB436	ABCB437	ABCB438
ABCB439	ABCB440	ABCB441
ABCB442	ABCB443	ABCB444
ABCB445	ABCB446	ABCB447
ABCB448	ABCB449	ABCB450
ABCB451	ABCB452	ABCB453
ABCB454	ABCB455	ABCB456
ABCB457	ABCB458	ABCB459
ABCB460	ABCB461	ABCB462
ABCB463	ABCB464	ABCB465
ABCB466	ABCB467	ABCB468
ABCB469	ABCB470	ABCB471
ABCB472	ABCB473	ABCB474
ABCB475	ABCB476	ABCB477
ABCB478	ABCB479	ABCB480
ABCB481	ABCB482	ABCB483
ABCB484	ABCB485	ABCB486
ABCB487	ABCB488	ABCB489
ABCB490	ABCB491	ABCB492
ABCB493	ABCB494	ABCB495
ABCB4		





**Supplementary Fig 7. Other metabolic pathway reconstruction of MAGs recovered from Emmental group.** The colors inside EC number boxes represent the following taxa: *D. dubossi* in green; *H. apodemus* in pink and *Lg. murinus* in blue.