

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

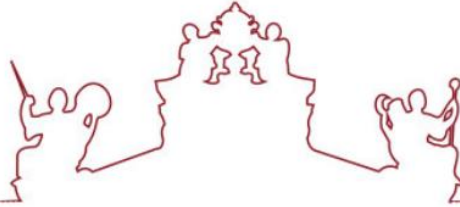
**EarlyMYCO – Exposição precoce a micotoxinas e o seu
impacto na microbiota intestinal**

Inês Santos Silva

Orientador(es) | Ana Teresa Caldeira
E L Duarte
Ricardo Manuel Abreu Assunção

Évora 2021





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

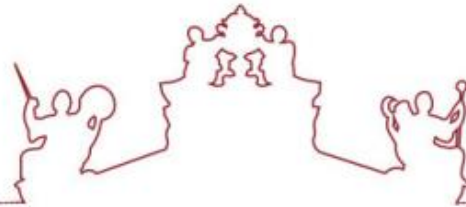
**EarlyMYCO – Exposição precoce a micotoxinas e o seu
impacto na microbiota intestinal**

Inês Santos Silva

Orientador(es) | Ana Teresa Caldeira
E L Duarte
Ricardo Manuel Abreu Assunção

Évora 2021





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)

Vogais | E L Duarte (Universidade de Évora) (Orientador)
Maria Rosário Martins (Universidade de Évora) (Arguente)

Évora 2021



“ A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales “

Marie Curie

Para todos aqueles que me são queridos

Agradecimentos

Quero prestar a minha imensa gratidão a todas as instituições e pessoas que me apoiaram no decorrer do meu trabalho. Em primeiro lugar, agradecer à Universidade de Évora, a instituição onde realizei todo o meu percurso académico e onde fui bem recebida desde o primeiro dia. Agradecer ao Laboratório Hércules que me acolheu da melhor maneira, onde aprendi muito e onde me cruzei com pessoas bondosas e trabalhadoras, que nunca me recusaram ajuda e sempre demonstraram o maior dos profissionalismos. Às instituições que colaboraram neste projeto EarlyMyco mas, em especial, à Fundação Champalimaud que contribuiu de forma desmedida, quando se prontificaram a enviar as amostras com a devida qualidade, de modo que eu conseguisse realizar o meu estudo; e igualmente, ao co-orientador Dr. Ricardo Assunção pelas dicas, pelas palavras e disponibilidade.

À minha orientadora Professora Elsa Duarte por ter aceite de imediato trabalhar comigo, pela confiança, e por me ter desafiado com este projeto tão interessante e esta experiência inesquecível. Quero prestar um agradecimento especial à minha orientadora Professora Teresa Caldeira por me ter recebido de braços abertos, por estar sempre disponível, por todo o apoio incansável, companheirismo, orientação e ajuda. Agradecer igualmente à Cátia Salvador por me ter integrado de forma tão generosa, por todos os ensinamentos, pela paciência, compreensão e por todas as horas de trabalho em conjunto, em que nunca me faltou apoio, motivação e uma palavra amiga e positiva; e à Sri, a primeira pessoa que me mostrou “os cantos à casa”, o meu obrigada pelos momentos de partilha, entajuda e enorme disponibilidade em tudo.

Agradeço também ao meu namorado, Pedro, por todo o apoio incondicional, todo o carinho e amor, pela enorme paciência quando as coisas não corriam como eu esperava, pelas palavras positivas e por estar sempre ali quando eu preciso; e, especialmente, por ser a pessoa que mais acredita em mim e me permitir continuar a partilhar as minhas maiores conquistas com ele. Ao meu pai, a pessoa extraordinária cujo apoio não se descreve por palavras ao longo de todo o meu percurso académico, sempre pronto para ouvir os meus desabafos, para me aconselhar, para me fazer companhia e por ter sempre um “vai correr tudo bem” para me

animar; e à minha mãe, que sempre foi um exemplo de superação para mim e me incentiva todos os dias a ser uma pessoa melhor. Por fim, expresso a minha gratidão às minhas amigas mais próximas, Mariana e Sofia, que estiveram lá para me ouvir, para me apoiar, para me fazer sorrir e para tornar este caminho repleto de alegria e leveza.

Obrigada a todos vocês, do fundo do coração, pois sem o vosso carinho e apoio esta jornada não teria o mesmo sabor!

Abreviaturas

Acot12 - Acil-coenzima A tioesterase 12 (do inglês, *Acyl-CoA Thioesterase 12*)

AFB1 – Aflatoxina B1

AFBO - Aflatoxina B1-8,9-epóxido

A-GPC – 1-araquidonoil-GPC (do inglês, *1-arachidonoyl-GPC*)

AHL - N-acil homoserina lactona (do inglês, *N-Acyl homoserine lactone*)

Akt – Proteína cinase B

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)

CCR – Cancro colorretal

CO – Monóxido de carbono

CODH – Monóxido de carbono desidrogenase

CoNS – *Staphylococcus* coagulase negativo (do inglês, *Coagulase-negative staphylococci*)

CoPS – *Staphylococcus* coagulase positivo (do inglês, *Coagulase-positive staphylococci*)

CytK – Citotoxina k (do inglês, *Cytotoxin K*)

DII – Doença inflamatória intestinal

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPP-4 – Dipeptidil peptidase-4

dsDNA – DNA de cadeia dupla (do inglês, *double strand DNA*)

DSS - Sulfato de sódio dextrano (do inglês, *Dextran Sulfate Sodium*)

ECF – Fatores sigma de função extracitoplasmática (do inglês, *Extracytoplasmic Function*)

ECN - Enterocolite necrosante

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica (do inglês, *Enterohemorrhagic Escherichia coli*)

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxinogénica (do inglês, *Enterotoxigenic Escherichia coli*)

FB - *Flush Buffer*

FOS – Fruto-oligossacáridos

FTL - *Flush Tether*

GLP-1 – Péptido semelhante à glucagina 1 (do inglês, *Glucagon-like peptide-1*)

GLP-2 - Péptido semelhante à glucagina 2 (do inglês, *Glucagon-like peptide-2*)

HBL – Hemolisina BL

hCG - Gonadotrofina coriônica humana (do inglês, *Human Chorionic Gonadotropin*)

HMOs – Oligossacáridos do leite humano (do inglês, *Human milk oligosaccharide*)

HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HTS - Sequenciação de elevado rendimento (do inglês, *High-Throughput Sequencing*)

IECs – Células do epitélio do intestino delgado (do inglês, *Intestinal-epithelial cells*)

IFN- γ - Interferão gama

IgA – Imunoglobulina A

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

IPEC-J2 - Células epiteliais do intestino delgado suíno (do inglês, *Intestinal porcine enterocytes*)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (do inglês, *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*)

LDH – Lactato desidrogenase

LPS – Lipopolissacárido

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *Major histocompatibility complex*)

NF- κ B - Fator nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear factor- κ B*)

NGS – Sequenciação de nova geração (do inglês, *Next generation sequencing*)

Nhe – Entero toxina não hemolítica (do inglês, *Non-haemolytic enterotoxin*)

OMVs - Vesículas de membrana externa (do inglês, *Outer membrane vesicles*)

ONT – *Oxford Nanopore Technologies*

OTUs – Unidades taxonómicas operacionais (do inglês, *Operational taxonomic units*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PD1/PD-L1- Proteína 1/ligando 1 de morte celular programada (do inglês, *Programmed death-1/ Programmed Cell Death Ligand 1*)

Pglyrps - Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (do inglês, *Peptidoglycan recognition proteins*)

PI3K - Fosfoinosítido 3-quinase (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinases*)

PMSG - Gonadotrofina sérica de égua grávida (do inglês, *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)

PULs – *Loci* de utilização de polissacáridos (do inglês, *Polysaccharide utilization loci*)

RAP - *Rapid Adapter*

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês, *Reactive oxygen species*)

SAA – Proteínas séricas amilóides A (do inglês, *Serum amyloid A*)

SCFAs – Ácidos gordos de cadeia curta (do inglês, *Short-chain fatty acids*)

sIgA – Imunoglobulina A secretória (do inglês, *Secretory immunoglobulin A*)

SII – Síndrome do intestino irritável

sIL-6R - Recetor solúvel da IL-6 (do inglês, *Soluble interleucin-6 receptor*)

SQB - *Sequencing buffer*

SRB – Bactéria redutora de sulfato (do inglês, *Sulfate-reducing bacteria*)

ssDNA – DNA de cadeia simples (do inglês, *Single strand DNA*)

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (do inglês, *Signal transducers and activators of transcription*)

TBE - Tris-Borato–EDTA

TE - Tris-EDTA

TEER – Resistência elétrica transepitelial (do inglês, *Transepithelial electrical resistance*)

TF α – Antígeno Thomsen-Friedenreich

TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor beta*)

TGI – Trato gastrointestinal

TJ – *Tight junctions*

TLR2 – *Toll-like receptor 2*

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

TLRs – *Toll-like receptors*

TNBS – Ácido trinitrobenzenossulfónico (do inglês, *Trinitrobenzene sulfonic acid*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α (do inglês, *Tumour necrosis factor α*)

Treg – Células T reguladoras

VRE – *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina (do inglês, *Vancomycin-resistant Enterococcus*)

ZO-1 – Zónula *occludens*-1

Convenções

% – percentagem

µg - micrograma

µL – microlitro

g – grama

GB - gigabyte

kg - quilograma

M - molar

min - minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

MB - megabyte

pM – picomolar

ppb – parte por bilião

ppm – parte por milhão

pb – par de bases

s – segundo

UFC – unidade formadora de colónias

Resumo

O microbioma intestinal no início da vida é fundamental para desencadear as defesas imunológicas mas as aflatoxinas ingeridas pelas mães podem passar para o leite materno e influenciar a microbiota. Neste trabalho estudou-se o impacto da exposição materna à aflatoxina B1 (AFB1), na microbiota no início da vida, através da exposição de ratinhos fêmea durante a gravidez e lactação. Estas foram alimentadas com *pellets* de gelatina contendo 400 µg/kg de AFB1 ou apenas com o veículo (grupo controle). As fezes dos descendentes foram colhidas imediatamente após o desmame e o DNA extraído e purificado. A diversidade dos taxa bacterianos e a abundância relativa foram avaliadas por HTS (*High-Throughput Sequencing*) utilizando as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA. Cento e vinte e quatro géneros bacterianos foram encontrados em ambos os grupos (teste e controle), 5 estavam presentes apenas nas ninhadas expostas a AFB1 e 27 exclusivamente nos grupos controle.

Palavras-chave: Exposição precoce; micotoxinas; microbiota; intestino; metagenómica

Abstract

EarlyMYCO – Early-life exposure to mycotoxins and its impact on gut microbiome

The intestinal microbiome in early life is essential for triggering immune defenses, but aflatoxins ingested by mothers can pass into breast milk and influence the microbiota. In this work, the impact of maternal exposure to aflatoxin B1 (AFB1) on the microbiota in early life was studied through the exposure of female mice during pregnancy and lactation. These were fed with gelatin *pellets* containing 400 µg/kg AFB1 or with vehicle alone (control group). The feces of the offspring were collected immediately after weaning and the DNA extracted and purified. The diversity of bacterial taxa and the relative abundance were evaluated by HTS (*High-Throughput Sequencing*) using the V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene. One hundred and twenty four bacterial genera were found in both groups (test and control), 5 were present only in litters exposed to AFB1 and 27 exclusively in control groups.

Keywords: Early exposure; mycotoxins; microbiota; intestine; metagenomics

Índice

Agradecimentos	i
Abreviaturas.....	iii
Convenções	vii
Resumo	viii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas	xiii
1. Problemática e objetivos	1
2. Fundamento teórico.....	5
2.1 Microbioma intestinal	5
2.1.1 Funções da microbiota no sistema gastrointestinal	5
2.1.2. Fatores que influenciam a microbiota intestinal.....	7
2.2. Desenvolvimento composicional e funcional da microbiota intestinal durante a infância.....	8
.....	12
2.2.1. Influência da alimentação materna no desenvolvimento do microbioma fetal	12
2.3. Espécies bacterianas presentes no microbioma humano	15
2.4. Micotoxinas	31
2.4.1. Interação das micotoxinas com a microbiota e com o trato gastrointestinal.	32
2.4.2. Efeitos tóxicos e sintomatologia.....	36
2.5. Aflatoxinas.....	37
2.5.1. Aflatoxina B1	39
2.5.2. Influência da AFB1 no intestino e no microbioma intestinal.....	45
3. Metodologia Experimental.....	49
3.1. Sequenciação de Nova Geração.....	50
3.1.1. Illumina Miseq.....	52
3.1.2. MinION Oxford Nanopore	56
3.2. Processamento das amostras intestinais.....	58
3.3. Extração do DNA.....	59

3.4. Purificação do DNA com esferas magnéticas.....	60
3.5. Eletroforese em gel de agarose	61
3.6. Quantificação do DNA	61
3.7. Sequenciação massiva de elevado rendimento	62
3.7.1. Amplificação por PCR	62
3.7.2. Indexação.....	62
3.7.3. Preparação da biblioteca de fragmentos e sequenciação	63
3.7.4. Análise de dados.....	64
3.8. Sequenciação massiva de elevado rendimento independente de PCR.....	65
3.8.1. Reação de amplificação e indexação	65
3.8.2. Preparação da biblioteca e sequenciação.....	65
3.8.3. Análise de dados.....	65
4. Resultados e discussão	66
4.1. Autoalimentação da micotoxina nas fêmeas grávidas	67
4.2. Extração e purificação do DNA fecal	69
4.3. Sequenciação massiva de elevado rendimento	72
4.4. Sequenciação massiva de elevado rendimento independente de PCR.....	130
5. Conclusão.....	143
6. Referências bibliográficas.....	149

Índice de Figuras

Figura 1: Mucosa intestinal saudável vs alterada (adaptado de Vincenso & Jordão, 2020) ..	7
Figura 2: Fatores que influenciam a microbiota intestinal	8
Figura 3: Evolução das espécies bacterianas no microbioma (adaptado de Zhuang et. al, 2019).....	12
Figura 4: Influência da alimentação materna no desenvolvimento do microbioma fetal.....	15
Figura 5: A função da barreira intestinal (adaptado de Lu et al., 2020).....	33
Figura 6: Interação das micotoxinas com o lúmen intestinal (adaptado de Lu et al., 2020)	36
Figura 7: Estrutura AFB1 (adaptado de Gutierrez, 2015)	40
Figura 8: Esquematização da metodologia utilizada no trabalho experimental	50
Figura 9: Tipos de tecnologia NGS (A) segunda geração (B) terceira geração (adaptado de Santos et al., 2020)	52
Figura 10: Fluxo de trabalho Illumina (adaptado de Illumina, 2016)	53
Figura 11: Análise da sequência do gene 16S rRNA usando o MinION™ (adaptado de Matsuo, 2021).....	58
Figura 12: Exposição materna à AFB1 nos ratinhos fêmea no início de vida	66
Figura 13: Otimização da autoalimentação da AFB1 nas fêmeas grávidas	67
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose antes (A) e após a purificação do DNA amplificado (B).....	70
Figura 15: Abundância relativa (%) dos taxa bacterianos relativos ao Filo	73
Figura 16: Abundância relativa (%) dos taxa bacterianos relativos ao Género.....	74
Figura 17: Abundância relativa (%) dos taxa bacterianos relativos à Espécie	75
Figura 18: Esquematização do índice de Shannon para as espécies presentes nas ninhadas controlo (Control) e tratadas com a AFB1 (Tox)	86
Figura 19: Esquematização do índice de Shannon para os géneros presentes nas ninhadas controlo e tratadas com a AFB1 (Tox), discriminando machos (m) e fêmeas (f)	87
Figura 20: Abundância relativa dos diferentes géneros, das ninhadas controlo e tratadas ..	88
Figura 21: Abundância relativa dos diferentes géneros, discriminando descendentes machos e fêmeas	89
Figura 22: Abundância relativa das diferentes espécies, das ninhadas controlo e tratadas..	90
Figura 23: Abundância relativa das diferentes espécies, discriminando descendentes machos e fêmeas	91
Figura 24: Core microbiome para o Género	104
Figura 25: Abundância relativa (%) bacteriana para o Género	131
Figura 26: Abundância relativa (%) bacteriana para a Espécie.....	132

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais espécies estudadas do género Bacteroides.....	19
Tabela 2: Espécies sulfidogénicas intestinais	22
Tabela 3: Produção de SCFAs por espécies bacterianas intestinais.....	26
Tabela 4: Potencialidade inflamatória das espécies bacterianas	28
Tabela 5: Potencial de degradação da AFB1 pelas espécies bacterianas	43
Tabela 6: Efeitos da AFB1 no intestino.....	45
Tabela 7: Efeitos da AFB1 no microbioma intestinal	47
Tabela 8: Condições de amplificação PCR	62
Tabela 9: Condições de amplificação PCR MinION.....	65
Tabela 10: Identificação das amostras de DNA de fezes de ratinho	68
Tabela 11: Concentração do DNA original (ng/μL) obtido por fluorimetria.....	71
Tabela 12: Géneros e espécies resultantes da análise core microbiome.....	105
Tabela 13: Comparação das plataformas de sequenciação para análise metagenómica 16S (adaptado de Santos et al., 2020).....	142

1. Problemática e objetivos

A exposição a contaminantes químicos nos primeiros 1000 dias de vida tem sido associada a alterações de saúde, constituindo um domínio emergente de pesquisa, fundamental para o conhecimento do exposoma humano. As micotoxinas, contaminantes químicos presentes nos alimentos, são um grupo de metabolitos secundários segregados por organismos fúngicos - na sua maioria pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium* – que podem exercer efeitos muito diversos na saúde humana, nomeadamente efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos, teratogénicos, imunossupressores e carcinogénicos (Ogunade et al., 2018).

O trato gastrointestinal (TGI) de humanos e outros mamíferos contém mais de 1000 espécies de microrganismos com uma população total de aproximadamente 10^{14} microrganismos, um número muito próximo do total de células somáticas do nosso corpo (Sender et al., 2016). A maioria dos microrganismos intestinais são bactérias, e estas, em conjunto com os metabolitos que produzem, não desempenham somente papéis importantes em processos biológicos (utilização de nutrientes, resistência do hospedeiro contra infeções, maturação do sistema imunológico e metabolismo do hospedeiro), mas também funcionam como uma ponte de ligação entre o hospedeiro e a sua dieta (S. Wang et al., 2020). Após a ingestão de alimentos ou rações contaminadas, o TGI é particularmente afetado pelas micotoxinas. Geralmente, a barreira intestinal funciona como um filtro contra estes contaminantes prejudiciais, todavia, embora sejam pouco conhecidos os potenciais efeitos decorrentes de uma exposição humana precoce a estes contaminantes, já foi descrito que algumas micotoxinas exercem inúmeros efeitos prejudiciais no TGI, nomeadamente por alteração das funções intestinais normais, alteração da histomorfologia do intestino e influência na absorção de nutrientes (Liew & Mohd-Redzwan, 2018).

Sabe-se atualmente que os períodos intra-uterino e pós-parto pertencem a períodos de tempo muito sensíveis na origem da adaptação do corpo aos estímulos ambientais, também descritos como comportamento adaptativo, graças à plasticidade do desenvolvimento (Sarron et al., 2020). Estudos recentes evidenciaram que as crianças portuguesas até aos 3 anos de idade -

janela crítica para a colonização do microbioma intestinal - estão expostas a múltiplas micotoxinas através da alimentação, o que constitui um risco potencial para a sua saúde (Assunção et al., 2015; Coppa et al., 2019).

O microbioma de um bebê é influenciado pelos diferentes microbiomas da mãe - boca, pele, vagina, TGI e leite materno; assim, o microbioma materno servirá como a base a partir da qual o do bebê se desenvolverá (Guerre, 2020). Dada a elevada probabilidade de exposição a estes contaminantes durante a gravidez, atualmente, as aflatoxinas têm atraído especial atenção, pois têm sido associadas ao aumento de marcadores inflamatórios sugerindo uma ligação potencial entre a exposição às aflatoxinas e resultados adversos no nascimento (Groopman et al., 2014; Smith et al., 2017).

A aflatoxina B1 é a principal toxina e um dos carcinogênicos naturais mais potentes produzido por espécies toxigênicas do género *Aspergillus*. Devido à sua crescente prevalência em produtos alimentícios, as micotoxinas parecem ser importantes, mas são, frequentemente, substâncias negligenciadas, embora possam afetar significativamente a homeostase intestinal, o que pode ter consequências na saúde. Assim, dado o seu potencial toxicológico, e porque os humanos são frequentemente expostos a elas, as entidades reguladoras, nacionais e internacionais, estabelecem limites máximos permitidos para estes compostos nos alimentos (De Ruyck et al., 2015).

Apesar de se conhecerem os efeitos da exposição via alimentar a micotoxinas numa fase adulta, muito pouco é conhecido acerca dos seus efeitos quando considerada uma exposição precoce, em especial até aos 6 meses pós-nascimento. As crianças apresentam vias de exposição únicas no que diz respeito aos produtos químicos nos alimentos, nomeadamente, no útero, através da placenta, e após o nascimento através da amamentação (Etzel, 2006). Embora o leite materno seja considerado a melhor e ideal forma de alimentação do lactente, alguns desses produtos químicos que passam para o bebê, são introduzidos pela dieta da mãe através do leite. A transferência de micotoxinas, dos alimentos para o leite materno, pode depender da diversidade alimentar e da hidratação da mãe, das propriedades físico-químicas do contaminante, da frequência da alimentação infantil e também, eventualmente, de infeções mamárias (Warth et al., 2016).

Desta forma, considerando a aparente transferência lactacional de muitas micotoxinas (transferência do plasma materno para o leite), a exposição de bebês merece atenção redobrada (Warth et al., 2016), uma vez que mesmo pequenas alterações na função da barreira intestinal em desenvolvimento, podem levar à exposição a antigénios luminais nas fases iniciais da vida e podem resultar em respostas imunológicas e manifestações clínicas exacerbadas (por exemplo, alergias alimentares, asma, diabetes e outros), em fases posteriores da vida (Akbari et al., 2017).

Esta proposta (tarefa 4, enquadrada no projeto FCT EarlyMYCO), pretende responder à pergunta principal: quais são os efeitos no microbioma intestinal associados à exposição precoce às micotoxinas? O trabalho de mestrado irá caracterizar a exposição de pares mãe-filho de ratinhos à aflatoxina B1, e também os seus potenciais efeitos tóxicos em ratinhos-bebês numa idade precoce (até aos 6 meses de idade), pretendendo determinar se essa exposição produz alterações no desenvolvimento do sistema imunitário gastrointestinal e na microbiota, através da variação dos taxa bacterianos nos ratinhos descendentes. Desta forma, os resultados deste projeto contribuirão, de forma inovadora, para um melhor conhecimento do impacto da alimentação na saúde, particularmente em dois grupos populacionais, mães a amamentar e os lactentes.

1.1. Objetivo geral - Avaliar as alterações no microbioma intestinal, no início da vida, em amostras de fezes de ratinhos recém-nascidos (DNA refrigerado) em relação à exposição à aflatoxina B1.

1.2. Objetivos específicos

1.2.1. Determinar e quantificar

- o DNA por fluorimetria;
- a integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose;
- a abundância relativa (%) dos vários taxa bacterianos presentes nas ninhadas expostas à AFB1 e nos controlos, pela sequenciação massiva de elevado rendimento, através das plataformas MinIONTM e Illumina Miseq;

- se existem diferenças estatisticamente significativas nas espécies bacterianas identificadas nas ninhadas, tratadas e controles, bem como entre machos e fêmeas, através do tratamento estatístico ANOVA;
- a diversidade microbiana entre as ninhadas pelo Índice de Shannon;
- se a exposição precoce a micotoxinas produz alterações no desenvolvimento do sistema imunitário gastrointestinal e na microbiota.

1.2.2. Avaliar

- o efeito das várias espécies bacterianas, compreendendo a função e a sua influência no microbioma intestinal infantil.

1.2.3. Correlacionar

- o sistema imunológico, a dieta e o microbioma intestinal;
- a alimentação com o surgimento de patologias.

2. Fundamento teórico

2.1 Microbioma intestinal

O microbioma intestinal representa um conjunto de microrganismos (e dos seus genomas) incluindo bactérias, vírus e fungos que colonizam o TGI dos organismos vivos. Mais de 10^{14} UFC colonizam o TGI, a grande maioria das quais estão localizadas no íleo e no cólon. Este conjunto de espécies co-evoluiu para uma comunidade complexa próxima ao hospedeiro, desenvolvendo uma relação de simbiose que lhe fornece funções fundamentais: proteção contra microrganismos patogénicos, assimilação de alimentos indigestos, produção de vitaminas essenciais, manutenção da homeostase e desenvolvimento do sistema imunológico (Vaga et al., 2020). Em particular, a microbiota intestinal, estável e saudável, é geralmente descrita pela rica diversidade de bactérias intestinais (Mosca et al., 2016). Já vários estudos revelaram diferenças na comunidade bacteriana intestinal entre locais anatómicos, entre indivíduos e entre os estados de saúde e doença. Como tal, o interesse crescente levou a uma pesquisa mais rigorosa nas comunidades de microrganismos que habitam o corpo humano, e à necessidade de descrever os seus genomas. A composição da microbiota intestinal varia significativamente nas proporções relativas dos filos, géneros e espécies dominantes, sendo determinada pela genética do hospedeiro, dieta, estilo de vida, etnia e ambiente de vida, promovendo uma importante variabilidade interindividual (Vaga et al., 2020).

2.1.1 Funções da microbiota no sistema gastrointestinal

A microbiota intestinal contribui para várias **funções fisiológicas**, como (i) funções protetoras (mobilização de microrganismos patogénicos, competição por nutrientes e recetores, produção de fatores antimicrobianos), (ii) funções estruturais (fortalecimento da barreira gastrointestinal, secreção de imunoglobulina A (IgA), desenvolvimento do sistema imunológico) e (iii) funções metabólicas (fermentação de resíduos alimentares não digeríveis, e de muco derivado do epitélio endógeno, síntese de vitaminas, controlo das células epiteliais intestinais, diferenciação e proliferação, absorção de iões); (iv) regulação

neuro endócrina e regulação do metabolismo energético; (v) prevenção de infeções da mucosa, bem como (vi) metabolização de uma vasta gama de substratos dietéticos. Por exemplo, o metabolismo dos hidratos de carbono é uma importante função catalítica da microbiota; nomeadamente bactérias dos géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacterium*, *Fecalibacterium* e *Roseburia* auxiliam na fermentação de polissacáridos complexos que escaparam da digestão proximal (Harmsen & de Goffau, 2016; Liew & Mohd-Redzwan, 2018). Desta forma, a microbiota intestinal está envolvida na regulação de múltiplas vias metabólicas do hospedeiro, dando origem a eixos metabólicos, de sinalização e imunoinflamatórios, que conectam fisiologicamente o intestino, o fígado, os músculos e o cérebro. Essa trajetória de desenvolvimento do microbioma, incorporando os microrganismos e os seus genomas coletivos, modula o fenótipo metabólico do hospedeiro e influencia muito a sua suscetibilidade a doenças (Nicholson et al., 2012). Um ecossistema intestinal saudável é essencial para a resistência à colonização, em que tanto a comunidade microbiana quanto as respostas imunes basais contra comensais residentes podem, juntas, prevenir o acesso de microrganismos patogénicos (Pham & Lawley, 2014).

O conceito de que a manutenção da estrutura e função microbiana intestinal é benéfica está esquematizado na Figura 1 e é sustentado pelo seguinte: (i) as bactérias intestinais comensais como um todo, ou como espécies individuais, e os seus metabolitos, têm atividades fisiológicas essenciais; (ii) a disbiose - ou seja, perturbações na estrutura ou composição das comunidades comensais residentes, em relação a indivíduos saudáveis - está associada a uma série de condições infecciosas, inflamatórias, funcionais e/ou nutricionais e (iii) a manipulação da microbiota pode melhorar ou prevenir algumas condições patológicas. Diversas abordagens terapêuticas atuais, direcionadas à microbiota intestinal, têm sido utilizadas para manter e melhorar a saúde do hospedeiro, incluindo-se a modificação da composição microbiana existente no intestino, principalmente através da alteração da disponibilidade de ingredientes alimentares não digeríveis (prebióticos) que podem estimular o crescimento e/ou atividade de algumas bactérias no cólon; a introdução ou expansão de “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (probióticos); ou por transplante de comunidades inteiras, ou porções da mesma, de outros doadores intestinais (Bäckhed et al., 2012; Browne et al., 2017; Parker et al., 2020).

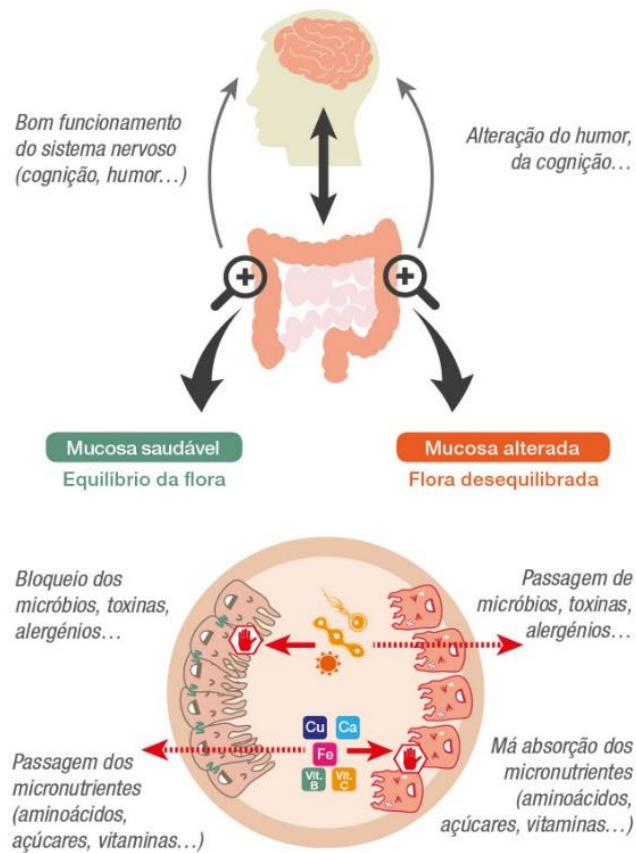


Figura 1: Mucosa intestinal saudável vs alterada (adaptado de Vincenzo & Jordão, 2020)

2.1.2. Fatores que influenciam a microbiota intestinal

A microbiota intestinal humana pode ser influenciada por diversos fatores esquematizados na Figura 2, nomeadamente: **(i)** o genoma do hospedeiro e a herdabilidade; **(ii)** o desenvolvimento precoce: a microbiota intestinal é estabelecida cedo na vida, mesmo antes do nascimento e, sobretudo, durante os primeiros 2-3 anos de vida ocorrem mudanças significativas como resultado da nutrição e do ambiente em geral; **(iii)** a dieta: é um dos principais causadores das diferenças na microbiota intestinal, uma vez que a ingestão de diferentes alimentos está associada à maior abundância relativa de diferentes microrganismos

comensais e, portanto, a composição da dieta favorece algumas espécies e prejudica outras (o mesmo pode acontecer com diferenças nos padrões alimentares e estilo de vida de distintas localizações geográficas); **(iv)** doenças e infecções: o tratamento com antibióticos pode afetar e destruir bactérias benéficas que residem naturalmente no intestino, alterando o perfil da microbiota do hospedeiro; **(v)** envelhecimento: geralmente ocorre um aumento no número total de anaeróbios facultativos, mudanças na proporção de espécies do filo *Bacteroidetes* para espécies do filo *Firmicutes* e uma diminuição acentuada de espécies do género *Bifidobacterium* em pessoas com idade superior a 60 anos (Nicholson et al., 2012).



Figura 2: Fatores que influenciam a microbiota intestinal

Com efeito, a conjugação de todas estas influências condicionam a microbiota intestinal dos indivíduos ao longo da sua vida.

2.2. Desenvolvimento composicional e funcional da microbiota intestinal durante a infância

A homeostase intestinal é definida como o estabelecimento de um equilíbrio entre a microbiota residente, o sistema imunológico e a integridade das células epiteliais. Esse evento ocorre durante os 1000 primeiros dias de vida, desde a fase fetal até aos 2-3 anos de

idade (Sarron et al., 2020). Este é um período de tempo crítico para que o intestino neonatal seja progressivamente colonizado com diferentes espécies bacterianas que promovem, coletivamente, a maturação intestinal (Sanidad & Zeng, 2020).

O crescimento e o desenvolvimento na infância são condicionados pelos eventos consecutivos pertencentes à programação perinatal. Esta programação da função intestinal está relacionada a uma série bem estabelecida de eventos celulares e moleculares que associam todos os tipos de células presentes neste órgão, incluindo neurónios, células endócrinas e imunológicas. No nascimento, esta maquinaria celular continua a desenvolver-se, com o estabelecimento da conexão entre sistemas entéricos e outros sistemas sistémicos, e está parcialmente sob o controlo da atividade da microbiota intestinal e a diversificação da população de microrganismos nela presentes. Assim, qualquer fator ambiental que interfira neste programa pré-estabelecido pode ter forte incidência nas funções corporais. Por todas essas razões, **mulheres grávidas, fetos e bebés serão particularmente suscetíveis** a fatores externos e, especialmente, a contaminantes alimentares (Sarron et al., 2020). Desta forma, **a microbiota intestinal durante a infância é a chave** para o desenvolvimento imunológico, o estabelecimento da tolerância oral e a função de barreira da mucosa. O intestino fetal há muito é considerado estéril, defendendo-se que a colonização ocorre apenas no parto. Embora controverso, este dogma foi recentemente questionado com a identificação aparente de bactérias, apesar de pouco abundantes, nas membranas fetais, líquido amniótico e placenta. Independentemente disso, **a dieta materna, antes e durante a gravidez, demonstrou influenciar o metabolismo do bebé**, bem como a suscetibilidade a alergias e infeções bacterianas. Os fatores maternos pré e pós-parto continuam a ser determinantes na colonização infantil precoce, incluindo o tipo de alimentos ingeridos pela mãe, tipo de parto, tempo de gestação, tipo de alimentação infantil etc. Acredita-se que a composição bacteriana do leite materno e os oligossacáridos do leite humano (HMOs) influenciem a microbiota intestinal infantil (Nyangahu et al., 2018). O leite materno contém certas proteínas e fatores de estimulação que aumentam o crescimento de bactérias benéficas no intestino do bebé, ou seja, tem a sua própria microbiota, cujas origens não são completamente compreendidas, mas acredita-se que seja parcialmente devido à translocação bacteriana (Nyangahu et al., 2018; Kumbhare et al., 2019).

Após o nascimento, a colonização microbiana do intestino envolve bactérias exógenas que se originam da microbiota da mãe (principalmente do intestino, da pele e da vagina), ou de outras fontes ambientais. Os **primeiros colonizadores** (gêneros bacterianos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*) (Sarron et al., 2020), consistem principalmente em **anaeróbios facultativos**, pois, inicialmente, o intestino do recém-nascido contém oxigênio em abundância, tratando-se de uma colonização oportunista; estes microrganismos criam um ambiente favorável para bactérias estritamente anaeróbias que, subsequentemente, dominam a microbiota dentro de algumas semanas, existindo uma substituição progressiva por microrganismos **estritamente anaeróbios**, como bactérias dos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Eubacterium*, consoante o ambiente intestinal se altera. Esse período inicial de colonização coincide com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que tem impacto no sistema nervoso entérico que inerva o TGI. As células enteroendócrinas do intestino segregam uma variedade de péptidos metabolicamente relacionados, todos conhecidos por estarem ligados à ingestão de alimentos, armazenamento de lípidos e homeostase energética e podem ser ativados por metabólitos microbianos, como ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs), que são uma fonte crítica de energia para os colonócitos (Nicholson et al., 2012). Também essas células desempenham um papel crítico na manutenção da hipóxia no lúmen intestinal, através do metabolismo celular que consome oxigênio, favorecendo o aparecimento de outros anaeróbios estritos como o gênero *Clostridium*, que degradam as fibras dietéticas e produzem esses SCFAs, sobretudo butirato (Sanidad & Zeng, 2020). Além do oxigênio, muitos outros fatores moldam o ambiente intestinal do recém-nascido, incluindo o pH, a motilidade intestinal, a disponibilidade de enzimas digestivas, bem como o metabolismo de hidratos de carbono complexos, proteínas e lípidos do hospedeiro. Há evidências de que os bebês amamentados têm um ambiente intestinal mais ácido devido à maior abundância de SCFAs, como resultado da colonização pelos gêneros bacterianos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Essa acidificação promove um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, constituindo assim uma defesa dos intestinos neonatais contra microrganismos patogênicos entéricos comuns, à medida que o sistema imunológico infantil amadurece (Sanidad & Zeng, 2020).

Assim, durante a infância, o estabelecimento de uma microbiota intestinal estável (homeostase intestinal) geralmente leva a **duas grandes transições**, esquematizadas na

Figura 3. A primeira transição ocorre logo após o nascimento, durante a lactação, e resulta no domínio da microbiota intestinal por bactérias dos géneros *Prevotella* e *Lactobacillus*, embora também possam estar presentes espécies do género *Bifidobacterium*. A segunda transição ocorre no período de desmame, com a introdução de alimentos sólidos e a continuação da alimentação com leite materno, resultando numa maior diversidade microbiana, maior abundância de SCFAs e, principalmente, no estabelecimento de um microbioma complexo dominado pelos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Tanaka & Nakayama, 2017; Sanidad & Zeng, 2020). Essas alterações continuam até aos três anos de idade, altura em que o comportamento das crianças promove claramente uma exposição significativa a microrganismos: contacto direto com a pele materna, introdução permanente de objetos ou pés na boca, curiosidade no toque com as mãos em várias superfícies, entre outros (Sylvia & Demas, 2018). Para além disso, são principalmente as mudanças radicais na dieta relacionadas ao desmame, uso de antibióticos e modificações na fisiologia do hospedeiro, desenvolvimento de distúrbios e doenças genéticas, bem como experiências stressantes, que contribuem para a natureza altamente dinâmica da microbiota intestinal (Derrien & Vlieg, 2015). As células imunitárias no intestino sofrem uma maturação gradual e sequencial, e cooperam num esforço convergente para promover a simbiose hospedeiro-microrganismo, minimizando reações imunes indesejadas às bactérias intestinais (Sanidad & Zeng, 2020). Após os três anos de idade, as comunidades microbianas intestinais desenvolvem uma riqueza, diversidade e estabilidade que se aproximam das características de um intestino adulto saudável, chamado o estado de **eubiose** (Derrien & Vlieg, 2015).

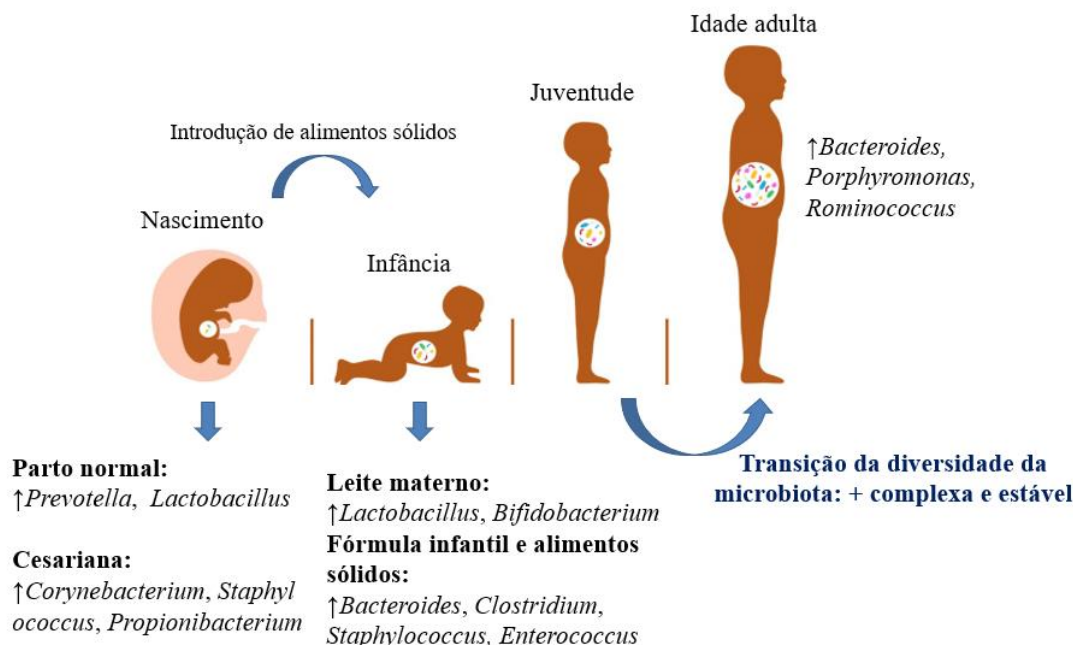


Figura 3: Evolução das espécies bacterianas no microbioma (adaptado de Zhuang et. al, 2019)

2.2.1. Influência da alimentação materna no desenvolvimento do microbioma fetal

Atualmente, está bem estabelecido que os fatores endógenos e exógenos moldam o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico intestinal. Deste modo, uma das questões que se tem colocado é se a exposição pré-natal, ou pós-natal, a contaminantes alimentares pode, de alguma forma, reprogramar o desenvolvimento geral do feto ou do bebê e, especialmente, se pode interferir na fixação da microbiota, recondicionando a maturação da mucosa intestinal, não apenas ao nível imunológico, mas também ao nível neuroendócrino (Sarron et al., 2020). As mães compartilham os seus microrganismos e metabolitos com o feto de diversas formas, incluindo no útero, no momento do parto vaginal, durante a lactação e, após o nascimento, através do contacto da pele e na amamentação; portanto, a saúde materna durante a gravidez, e no pós-parto, afeta, sem dúvida, o desenvolvimento do bebê (Kumbhare et al., 2019). Ou seja, como a microbiota intestinal desempenha um papel central na maturação da mucosa intestinal, e do sistema imunológico, muitos estudos têm focado o seu interesse em saber, na realidade, onde e quando começará a **transmissão da microbiota materna** (Sarron et al., 2020).

A gravidez é um estado peculiar de elevada vulnerabilidade, para a mulher e para o feto, devido à necessária adaptação a um ambiente supostamente nocivo que pode modificar a interação simbiótica materno-fetal. Fatores como genética, inflamação e dieta podem resultar nalgumas alterações permanentes, muitas vezes subtis, em diferentes órgãos, entre os quais o intestino ou o cérebro; e, igualmente, durante e após a gravidez, influenciar o futuro estado de saúde do ser humano (Sarron et al., 2020). Particularmente, a dieta não só fornece nutrientes ao organismo, mas também é a fonte mais importante de contaminantes ambientais de diversas origens, influenciando a saúde ao modular a composição e a diversidade da microbiota intestinal (Daliri et al., 2018). Durante os períodos de gestação e lactação, as fêmeas gastam uma energia considerável fornecendo aos seus filhos alimentos e nutrientes necessários, não apenas para os nutrir, mas também para fornecer muitos compostos bioativos diferentes que mantêm e facilitam o crescimento, modulam o sistema imunológico, protegem contra doenças e ajudam no desenvolvimento de uma microbiota intestinal saudável (Sylvia & Demas, 2018). Assim, o microbioma intestinal materno pode, potencialmente, influenciar a maturação do epitélio fetal e células imunes, produtos bacterianos, como agonistas dos *Toll-like receptors* (TLRs) ou metabolitos, e ainda SCFAs, que provavelmente circulam através da placenta até ao feto (Sanidad & Zeng, 2020). Recentemente, Kristen Meyer et al. (2017) demonstraram que a modificação da dieta materna (como alterar a ingestão de lípidos para hidratos de carbono ou alterar o consumo de açúcares específicos), está associada a alterações significativas na composição microbiana do leite e na composição dos HMOs; isto acontece porque o microbioma do leite materno e os HMOs entram em contato direto com os lactentes, por isso, sugere-se um possível papel dos hábitos alimentares maternos, durante e após a gravidez, na modificação e desenvolvimento da microbiota intestinal infantil (Meyer et al., 2017; Kumbhare et al., 2019). Outro exemplo de alimento são os cereais destinados ao consumo humano, que frequentemente se encontram contaminados por espécies de fungos dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*, sendo capazes de produzir metabolitos secundários altamente nocivos: **as micotoxinas** (Sarron et al., 2020).

Com base nas evidências atuais da literatura, é provável que ocorra uma **transferência placentária de micotoxinas**, logo na fase gestacional, e se acumule na circulação fetal no final da gravidez. Ou seja, as micotoxinas, presentes em alimentos contaminados que são

consumidos pela mãe, podem atravessar a barreira placentária, ser metabolizadas pelo feto, em desenvolvimento, e podem afetar os sistemas fetais; no entanto, também pode ocorrer uma **transferência das micotoxinas para o feto através do leite materno contaminado**, como ilustrado na Figura 4. Os bebês, provavelmente correm um risco maior de exposição a estas toxinas ambientais cancerígenas, devido à sua vulnerabilidade, caracterizada pela elevada taxa de absorção, baixa capacidade de eliminação e desintoxicação, rápida proliferação celular e mecanismos de reparação imaturos. A presença de micotoxinas no fluido intestinal de uma criança pode causar danos significativos aos enterócitos intestinais, devido à dimensão reduzida do epitélio intestinal, em comparação com o de um adulto. O feto pode ser afetado pela exposição materna a estes contaminantes através de toxicidade direta e indireta, através de inflamação sistêmica materna, comprometimento do crescimento placentário ou elevação das citocinas placentárias. Os seus efeitos citotóxicos e sistêmicos podem, plausivelmente, causar anemia materna, limitação do crescimento intrauterino, perda fetal e parto prematuro (Sarron et al., 2020). Desta forma, tem-se proposto que a exposição precoce às micotoxinas pode alterar e prejudicar o desenvolvimento do microbioma intestinal, aumentando o risco de infecções neonatais, bem como ativação inadequada de células imunes mais tarde na vida, contribuindo assim para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como asma e alergias (Sanidad & Zeng, 2020).

Assim sendo, todos estes fatores descritos anteriormente, que alteram a composição microbiana da mãe, podem modificar a abundância de genes bacterianos que favorecem certos processos metabólicos durante a gravidez e, deste modo, podem, precocemente, afetar a comunidade microbiana inicial do bebê (Kumbhare et al., 2019).

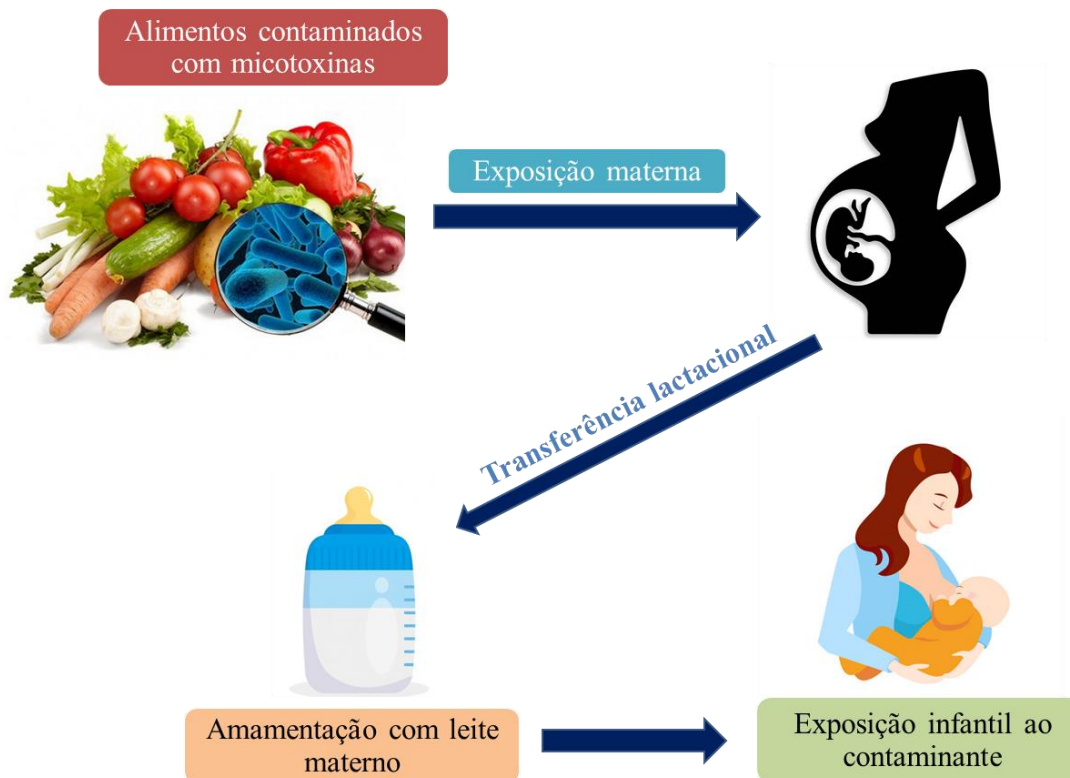


Figura 4: Influência da alimentação materna no desenvolvimento do microbioma fetal

2.3. Espécies bacterianas presentes no microbioma humano

O género *Bacteroides* corresponde a 25-50% da microbiota intestinal humana, sendo altamente adaptados à vida no intestino onde formam uma parte fundamental das teias alimentares microbianas (Aaron & Goodman, 2017); são **comensais, mutualistas e organismos benéficos** que podem estabelecer associações estáveis e de longo prazo com os seus hospedeiros humanos, conferindo inúmeros benefícios à saúde (Han et al., 2020).

Estas bactérias, anaeróbias obrigatórias e Gram-negativas potenciam a digestão dos alimentos, em particular, através da produção de hidrolases de glicosídeos que digerem os glúcidos para utilização dos nutrientes pelo hospedeiro (S. M. Lee et al., 2014). Estão envolvidos em muitas **atividades metabólicas importantes** no cólon humano, incluindo a fermentação de hidratos de carbono complexos, produção de SCFAs (acetato, propionato e

succinato) por hidrólise, utilização de substâncias nitrogenadas e a biotransformação de ácidos biliares e outros esteroides; atuam igualmente na **maturação imunológica** direta do hospedeiro (Patrick, 2014). Yanagibashi et. al (2009) demonstraram que os *Bacteroides* derivados da microbiota comensal de ratinhos, estimulam a produção de IgA na mucosa através do aumento da expressão da citidina desaminase, induzindo a diferenciação de células B em células IgA⁺; assim, os autores sugerem que as espécies deste género bacteriano estão **intimamente relacionadas à resposta imune mais importante do sistema imunológico** da mucosa intestinal (Yanagibashi et al., 2009).

Vários estudos já comprovaram que os *Bacteroides* têm diversos mecanismos bioquímicos que lhes permite adaptar e persistir no ambiente dinâmico do TGI, ou seja, eles podem melhorar ativamente o ambiente intestinal para torná-lo mais acolhedor para si e para outros microrganismos. Por exemplo, têm capacidade de tolerar e reduzir os níveis de oxigénio, o que provavelmente os ajuda a dispersarem para novos hospedeiros e é, possivelmente, a principal razão pela qual eles estão tão difundidos entre os mamíferos. Também inúmeros fenómenos de inversão de DNA, transposões conjugativos e mobilizáveis, e vários fatores sigma de função extracitoplasmática contribuem para essa diversidade e adaptabilidade dos *Bacteroides* (Patrick, 2014). Este género bacteriano pode alterar o panorama nutricional do intestino, promovendo mudanças fisiológicas no seu hospedeiro para induzir a produção de certas fontes de alimentos, como glicoproteínas, ou pela libertação de resíduos de fucose e ácido siálico, que podem ser metabolizadas por outros microrganismos patogénicos (Aaron & Goodman, 2017).

Como referido anteriormente, os *Bacteroides* são conhecidos por terem uma **potente capacidade de degradar glicanos**, incluindo aqueles sintetizados pelo hospedeiro e polissacáridos da dieta resistentes à degradação mediada pelo mesmo, por exemplo sulfato de condroitina, mucina, hialuronato e heparina, que estão presentes nas células epiteliais intestinais (D'Elia & Salyers, 1996). Estas bactérias realizam isso através de agrupamentos de genes, que parecem ser exclusivos deste género, denominados **loci de utilização de polissacáridos (PULs)**. Estes são a maior maquinaria proteica bacteriana conhecida para a aquisição de polissacáridos, e para iniciar o seu metabolismo na maioria dos *Bacteroides* spp.. São constituídos por glicosidases, um complemento de proteínas de ligação aos glicanos

da superfície celular, recetores/transportadores de oligossacáridos de membrana externa, mecanismos de captação nas suas membranas citoplasmáticas e enzimas metabólicas de hidratos de carbono citoplasmáticos; podem determinar que vias metabólicas os *Bacteroides* podem ocupar e delimitar as suas localizações biogeográficas no trato intestinal. Esta capacidade parece ser um fator importante que permite que essas bactérias colonizem inicialmente o intestino, durante a infância, e persistam lá ao longo da vida (Aaron & Goodman, 2017; Zafar & Saier, 2021). Para além disso, esta maquinaria permite que estes microrganismos estejam envolvidos em relações de alimentação cruzada entre espécies intestinais, auxiliando os microrganismos vizinhos a obterem os nutrientes desejados, fundamentais para a saúde humana (Zafar & Saier, 2021).

Relativamente à sua **prevalência no microbioma dos bebés**, a abundância relativa dos *Bacteroides* spp. depende significativamente do modo de nascimento e do tipo de leite consumido nos primeiros cinco meses de vida. Este género aumenta em bebés nascidos por parto vaginal e alimentados com fórmulas infantis, comparativamente a bebés nascidos por cesariana e alimentados com leite materno (Zafar & Saier, 2021). Para além disso, uma vez que são os principais microrganismos que degradam polissacáridos complexos, são maioritários no momento em que se introduzem alimentos sólidos na dieta infantil, sendo *Bacteroides thetaiotamicron* a espécie mais abundante dos 6 aos 12 meses. Passado esse período, predominam *B. fragilis*, *B. ovatus* e *B. xylanisolvens*. **Na idade adulta**, a prevalência deste género bacteriano varia também com a dieta (sendo mais elevada a sua abundância em dietas ricas em fibra e proteína animal), com o ambiente e com a eventual utilização de antibióticos, sendo as espécies *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *B. thetaiotamicron* as mais comuns (Zafar & Saier, 2021).

Por todas as particularidades descritas anteriormente, os *Bacteroides* têm sido considerados potenciais **probióticos**, principalmente pela capacidade de fermentação versátil de hidratos de carbono e produção concomitante de SCFAs, biotransformação de ácidos biliares e esteroides, efeitos imunomoduladores e prevenção da colonização de microrganismos patogénicos (Saarela, 2019), inclusive já foi descrito como sendo importante na microbiota intestinal de ratos na resistência à colonização contra *Pseudomonas aeruginosa* (Momose et al., 2011).

No entanto, apesar das suas características benéficas, **possuem papel duplo**, o que significa que podem ser **microrganismos patogênicos oportunistas**, dependendo da sua localização no hospedeiro. Quando esta espécie bacteriana escapa do intestino, é responsável por muitos tipos de infecções, bacterémias e abscessos que podem ocorrer em várias partes do corpo, normalmente não colonizadas por este género, incluindo o sistema nervoso central – por terem capacidade de penetração da barreira hematoencefálica - a cabeça, o pescoço, o tórax, o abdómen e a pele, principalmente porque conseguem transferir os seus fatores de virulência para microrganismos e células vizinhas (Patrick, 2014; Zafar & Saier, 2021). Esta **translocação do intestino para localizações extraintestinais** pode ser atribuído a vários fatores que incluem um sistema imunitário comprometido, permeabilidade intestinal aumentada, uso excessivo de antibióticos e a idade (Zafar & Saier, 2021). Dos **fatores de virulência** que fazem parte das suas características patogênicas inclui-se os seus sistemas capsulares polisacarídicos complexos e proteases, bem como a sobrevivência ao stress oxidativo; hemolisinas/citolisinas que servem para desenvolver sistemas de infeção, uma vez que lisam e matam as células imunes hospedeiras, não só contribuindo para a sobrevivência de microrganismos patogênicos mas também enfraquecendo o sistema imunitário hospedeiro; e, para além disso, os sistemas de secreção tipo 9, uma via metabólica de exportação proteica que possibilita causar danos aos tecidos hospedeiros e manipular as suas respostas imunes, bem como auxiliar na formação de biofilmes, adesão e motilidade bacteriana (Zafar & Saier, 2021).

Assim, no local adequado do corpo e em condições ambientais apropriadas, as espécies deste género serão benéficas mas, em locais do corpo inadequados, podem tornar-se prejudiciais. É incrível como os *Bacteroides* spp. têm uma maquinaria metabólica sofisticada que os capacita para desempenhar tantos papéis no intestino (comensais, microrganismos benéficos e patogênicos oportunistas), reflexo de um processo co evolutivo muito vasto; no entanto, são necessárias, futuramente, mais pesquisas que ajudarão a revelar detalhes fisiológicos e metabólicos sobre as estirpes menos conhecidas e as suas interações (Zafar & Saier, 2021).

A Tabela 1 resume os principais efeitos e características, sobretudo a nível intestinal, provocados por algumas espécies bacterianas deste género:

Tabela 1: Principais espécies estudadas do gênero *Bacteroides*

Espécie/estirpe bacteriana	Principais efeitos no hospedeiro e na microbiota	Referências
<p><i>B. acidifaciens</i> JCM10556</p>	<p>Melhora a intolerância à glicose e a resistência à insulina em ratinhos com diabetes tipo II, desempenhando um papel benéfico no metabolismo da glicose em humanos e animais; Ativa a via de oxidação dos ácidos gordos nos tecidos adiposos; Ativa a dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) no intestino e, subsequentemente, aumenta o péptido semelhante à glucagina 1 (GLP-1), o que pode contribuir para a homeostase da glicose; Papel na prevenção de doenças metabólicas, como diabetes e obesidade; Aumenta a produção das interleucinas 6 e 10 aumentando a expressão de moléculas de MHC de classe II.</p>	<p>Gurung et al., 2020 J. Y. Yang et al., 2017</p>
<p><i>B. acidifaciens</i> A40</p>	<p>Promove a produção de anticorpos IgA em ratos, essencial para a defesa da mucosa intestinal contra microrganismos patogênicos nocivos; Papel na função imunológica intestinal, proteção contra microrganismos patogênicos intestinais e na redução das doenças inflamatórias do intestino.</p>	<p>J. Y. Yang et al., 2017 Nakajima et al., 2020</p>
<p><i>B. acidifaciens</i> DSM15896</p>	<p>Associado ao cancro da bexiga em ratos imunodeficientes, por se verificar um crescimento tardio do tumor na sua presença; Controla a expressão de um conjunto de genes envolvidos na utilização do amido, através dos sistemas de utilização de amido; Fornece aminoácidos essenciais críticos para o metabolismo epitelial intestinal. Induz fucosilação das células epiteliais intestinais, que está ligada à sua capacidade de usar fucose, um componente da mucina glicosilada. Esta fucose livre, ou o ácido siálico, podem ser usados como fonte de carbono por outros microrganismos patogênicos, por exemplo, <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium e <i>Clostridium difficile</i>.</p>	<p>Then et al., 2020 D'Elia & Salyers, 1996; Zocco et al., 2007 Grondin et al., 2017 Catlett et al., 2020</p>

(Continua na página seguinte)

Tabela 1: Principais espécies estudadas do gênero *Bacteroides* (continuação)

Espécie/estirpe bacteriana	Principais efeitos no hospedeiro e na microbiota	Referências
<p><i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482</p>	<p>Aumenta os níveis de mRNAs que codificam o transportador de glutamato e glutamato descarboxilase em células epiteliais - associado a efeitos positivos em indivíduos obesos;</p> <p>Aumenta a diferenciação das células caliciformes, favorecendo a produção de muco;</p> <p>Diretamente envolvido na formação de redes de células enteroendócrinas em todo o TGI;</p> <p>Expressa um gene que especifica um fator de transcrição (BT4338), com um papel crucial na aquisição e utilização de uma ampla variedade de hidratos de carbono. Esse gene codifica uma proteína (fusA2), que promove tolerância imunológica no intestino dos ratinhos; reverte o dano epitelial provocado por citocinas pró-inflamatórias, modificando a resistência elétrica transepitelial (TEER) e a permeabilidade.</p>	<p>Wrzosek et al., 2013;</p> <p>Baumler & Sperandio, 2017;</p> <p>R. Liu et al., 2017;</p> <p>Duan et al., 2020;</p> <p>Modasia et al., 2020;</p> <p>Han et al., 2020</p>
<p><i>B. thetaiotaomicron</i></p>	<p>Poderoso regulador benéfico do sistema imunológico intestinal; propriedades anti-inflamatórias; pode aumentar a função de barreira da mucosa e pode limitar a invasão de microrganismos patogênicos;</p> <p>Induz uma resposta imune sistêmica e local, documentada pelo aumento dos níveis séricos de IgA na mucosa, importante na função de barreira intestinal.</p>	<p>Sitkin & Pokrotnieks, 2019</p> <p>Zocco et al., 2007</p>
<p><i>B. thetaiotaomicron</i> DSM 2079</p>	<p>Capacidade de melhorar a inflamação no colón em ratos <i>knockout</i> para a interleucina-10 (IL-10); aumenta os complexos motores do cólon, podendo constituir um papel importante na motilidade colónica e na manutenção da homeostase intestinal.</p>	<p>Aktar et al., 2020</p>
<p><i>B. xylanisolvens</i> XB1A^T</p>	<p>Exibe uma elevada atividade xilanolítica, conduzindo à libertação de produtos que podem ter efeitos benéficos na saúde humana; e atividade pectinolítica intestinal, possuindo 6 PULs dedicados à degradação da pectina;</p> <p>Possui plasticidade metabólica em relação aos polissacáridos dietéticos (amido, frutano, xiloglucano, β-manano, xilano e pectina), que contribui para a sua aptidão competitiva no ecossistema intestinal humano.</p>	<p>Philippe Ulsemer et al., 2012;</p> <p>Despres et al., 2016;</p> <p>M. Zhang et al., 2014;</p> <p>Despres, 2016</p>

(Continua na página seguinte)

Tabela 1: Principais espécies estudadas do género *Bacteroides* (continuação)

Espécie/estirpe bacteriana	Principais efeitos no hospedeiro e na microbiota	Referências
<i>B. xylanisolvens</i> DSM23964	Considerada a primeira estirpe probiótica natural do género <i>Bacteroides</i> - organismo não oportunista e não patogénico; Resistente à ação de enzimas do suco gástrico e intestinal, pouco provável de transferir ou adquirir resistência a antibióticos e é livre de qualquer atividade de virulência descrito para o género; Não possui atividades de exoenzimas que se sabe que estão envolvidas no desenvolvimento do processo de infecção (colagenase, neuraminidase, DNase, hialuronidase etc.); Não se liga de forma estável às células epiteliais intestinais humanas; Aumenta a geração de imunoglobulina M (IgM), anticorpos específicos para o antígeno Thomsen-Friedenreich (TF α) em humanos adultos.	Tan et al., 2019 Philippe Ulsemer et al., 2012 P. Ulsemer et al., 2016

Outras duas das principais espécies bacterianas que dominam o intestino humano, *Bilophila wadsworthia* e *Desulfovibrio piger* - descritas por J. Baron et al. em 1988 e por Moore et. al em 1976, respetivamente - pertencem ao grupo das bactérias redutoras de sulfato (SRBs), sendo designadas de **espécies sulfidogénicas intestinais** (Kasten et al., 1992; Julien Loubinoux et al., 2002). Estes microrganismos anaeróbios conduzem à redução dissimilatória de sulfato (SO₄⁻²) para obter energia, utilizando o sulfato como aceitador final de eletrões e lactato, piruvato, etanol e hidrogénio como doadores de eletrões para essa reação, acumulando sulfeto e acetato (Julien Loubinoux et al., 2002). Assim, podem influenciar significativamente o ambiente intestinal, uma vez que, ao mesmo tempo que competem por nutrientes, têm capacidade de metabolizar compostos sulfatados e produzir **sulfureto de hidrogénio (H₂S)**; um composto nocivo que, apesar de estar presente em baixas concentrações (não letais) no cérebro, coração, vasos sanguíneos, trato geniturinário e gastrointestinal, é altamente citotóxico, mutagénico e cancerígeno para as células epiteliais do intestino, desencadeando inflamação direta, e, conseqüentemente, prejudicando a barreira intestinal (Z. Feng et al., 2017; Kushkevych et al., 2018; Dordević et al., 2021). Assim, está envolvido na iniciação e manutenção de **doenças inflamatórias intestinais**, sendo

frequentemente encontrado nos intestinos e fezes (numa concentração de 0,22 a 3,38 mmol/kg) de pessoas e animais com esse tipo de patologias, particularmente a doença de Chron e a colite ulcerativa (Kushkevych, Dordević, et al., 2019).

A Tabela 2 resume as principais particularidades e estudos realizados que evidenciam os efeitos provocados por estas espécies bacterianas no intestino.

Tabela 2: Espécies sulfidogênicas intestinais

Espécie bacteriana	Efeitos associados ao intestino	Referências
<i>Bilophila wadsworthia</i>	Espécie virulenta; frequentemente encontrada em apêndices inflamados de crianças e adultos, bacteremias e outros processos inflamatórios.	Summanen et al., 1995; Schumacher et al., 1997
	Capacidade de aderência às células intestinais embrionárias humanas, provavelmente devido a presença de proteínas de membrana externa reguladas por ferro.	Baron, 1997; Gerardo et al., 1998
	Presença de genes envolvidos na fosforilação oxidativa, que codificam para a CODH, fornecendo competência para habitar locais onde a saturação de O ₂ é muito baixa (interface epitelial).	Veiga et al., 2014
	Possui um conjunto de genes que permite a respiração anaeróbia de nitrato, um substrato que é igualmente enriquecido durante o processo inflamatório.	Veiga et al., 2014
	Realiza um tipo único de respiração anaeróbia em que a taurina é usada como fonte de sulfito, cujo produto metabólico é H ₂ S, pró-inflamatório e tóxico para o tecido da mucosa intestinal.	S. Silva et al., 2008; Z. Feng et al., 2017
	Capacidade de se ligar a células epiteliais humanas do cólon; inibe a β-oxidação de SCFAs pelos colonócitos, privando-os de energia e comprometendo a função de barreira – possível papel na carcinogênese colorretal.	Z. Feng et al., 2017; Dolan & Chang, 2017
	Aumenta a inflamação do tecido intestinal em ratos que carecem da citocina anti-inflamatória IL-10.	Sonnenburg & Bäckhed, 2016

(Continua na página seguinte)

Tabela 2: Espécies sulfidogénicas intestinais (continuação)

Espécie bacteriana	Efeitos associados ao intestino	Referências
<i>Desulfovibrio piger</i>	Causa uma variedade de infeções mono e polimicrobianas do trato gastrointestinal (colecistite, abscessos do abdómen, enterocolite ulcerativa).	Kushkevych, Bolis, et al., 2019; Kushkevych, Dordević, et al., 2019
	A libertação e interação dos seus lipopolissacáridos (LPS) com macrófagos estimula a resposta imune por libertação de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e IL-6.	Amirkhanzadeh et al., 2020
	A sua colonização está associada a níveis significativamente mais baixos de mRNAs que codificam várias subclasses de imunoglobulinas e proteínas das <i>tight junctions</i> (TJ) claudina-4.	Rey et al., 2013
	Forte candidato para diminuir a autoimunidade de células imunes no lúmen intestinal (\downarrow TCD4 ⁺ CXCR3 ⁺ e CD8 ⁺ CXCR3 ⁺).	Groot et al., 2021
	Ao reduzir o sulfato, faz com que as reservas de enxofre do hospedeiro (e de outras bactérias) se esgotem, sendo este um composto importante em muitas reações fisiológicas no ser humano.	Finegold et al., 2012

Uma das espécies mais abundantes na microbiota intestinal humana (0,5–5% do total de bactérias), *Akkermansia muciniphila*, foi assim nomeada em homenagem ao ecologista microbiano holandês Antoon Akkermans (Ouyang et al., 2020). Isolada e caracterizada por Muriel Derrien em 2004, esta descoberta foi iniciada pela noção de que o corpo humano produz os seus próprios “prebióticos” ou substratos microbianos, nomeadamente a mucina composta por glicoproteínas que são especificamente produzidas e degradadas no cólon (Cani & de Vos, 2017), embora também seja detetada noutros locais, cuja função pode ser distinta, nomeadamente no leite humano, cavidade oral, pâncreas, sistema biliar, intestino delgado e apêndice. O muco cobre a camada externa das células epiteliais do intestino e serve como proteção física contra a penetração de microrganismos e compostos nocivos (Ouyang et al., 2020). *A. muciniphila* utiliza a mucina como única fonte de carbono, azoto e energia, convertendo este polímero em acetato e propionato, sendo a sua atividade central degradar a mucina, utilizando o seu repertório particularmente vasto de enzimas mucolíticas codificadas

no seu genoma (Geerlings et al., 2018). Uma vez que as mucinas que a bactéria degrada, são os principais componentes orgânicos das camadas de muco que protegem o epitélio do TGI, respiratório e urinário contra microrganismos patogênicos e danos mecânicos, significa que esta espécie bacteriana pode ter efeito benéfico na saúde, provavelmente com base na **regulação da espessura do muco e integridade da barreira intestinal, mas também na modulação do sistema imunológico** (Ouyang et al., 2020; Trastoy et al., 2020). Esta bactéria também afeta genes envolvidos no metabolismo celular dos lípidos, desempenha um papel na normalização da endotoxemia metabólica e do metabolismo do tecido adiposo (Geerlings et al., 2018). Além disso, exibe outras múltiplas funções biológicas, incluindo inibição da inflamação pelo aumento dos níveis intestinais de endocanabinóides, aumento da expressão de péptidos antimicrobianos intestinais e, muito importante, alimentação cruzada, denominada sintrofia em conjunto com outras espécies da microbiota; deste modo, pode contribuir para a expansão de outras espécies benéficas, ao mesmo tempo que pode ter um efeito direto sobre o metabolismo do hospedeiro (Dao et al., 2016).

A. muciniphila está presente no trato intestinal em diferentes fases da vida; **coloniza o trato intestinal na infância** e atinge 1–4% da microbiota fecal na idade adulta (Ouyang et al., 2020). A colonização intestinal do bebê pela bactéria gram-negativa descrita anteriormente é detetada desde o primeiro mês de vida, com abundância continuamente crescente durante a idade adulta (Geerlings et al., 2018). Tem a capacidade de degradar as estruturas dos HMOs em açúcares mais simples, libertando SCFAs (acetato e propionato); uma vez que utiliza o leite humano como única fonte de energia, carbono e azoto, é previsível a sua presença específica no leite materno e no tecido mamário de mulheres lactantes, o que pode beneficiar a maturação do estabelecimento da microbiota e do sistema imunológico do bebê, uma vez que se sugere que a sua proteína de membrana externa (Amuc-1100) está envolvida na regulação imunológica. Além disso, a sua capacidade de degradação de polissacáridos já provou ter um papel importante na colonização inicial do intestino do bebê, tendo assim um grande impacto na vida posterior. Portanto, **a sua presença no intestino infantil pode ser considerada um marcador para o desenvolvimento e diversidade da microbiota intestinal** (Geerlings et al., 2018). Considerando todas as suas funções no microbioma, e tendo em conta que é particularmente abundante em todas as fases da vida, *A. muciniphila* é considerada um microrganismo benéfico, promissor para o tratamento de

algumas doenças, incluindo distúrbios metabólicos e cânceros. É muitas vezes designada como a “**sentinela do intestino**”, demonstrando promover a integridade da barreira intestinal, modular a resposta imunológica, inibir a inflamação e aumentar a expansão de bactérias produtoras de butirato (Ouyang et al., 2020).

Para além da *A. muciniphila*, existem outras espécies bacterianas intestinais produtoras de **ácidos gordos de cadeia curta**, principalmente butirato, acetato e propionato. Estes metabolitos surgem como um dos principais mecanismos pelos quais as bactérias exercem os seus efeitos benéficos à saúde intestinal, sendo produzidos no cólon pela fermentação bacteriana de fibras alimentares e amido (Y. Silva et al., 2020). Constituem fontes de energia para os tecidos do hospedeiro e exercem efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos que podem ser importantes para **(i)** a manutenção da integridade da mucosa e redução da inflamação intestinal; **(ii)** a regulação da lipogénese; **(iii)** a determinação do ambiente intestinal, influenciando o pH, o trânsito intestinal, a absorção de nutrientes e o equilíbrio microbiano no intestino grosso; **(iv)** a ativação do tecido adiposo e regulação da função mitocondrial do fígado; **(v)** a prevenção do cancro colorretal e colite, bem como para a fisiopatologia da obesidade e doenças relacionadas; **(vi)** a homeostase energética de todo o corpo e controlo do sono e apetite; **(vii)** a regulação do trânsito gastrointestinal, permeabilidade e motilidade intestinal; **(viii)** a modulação da função das células dendríticas e produção de muco intestinal pelas células caliciformes; **(ix)** a prevenção da expansão disbiótica de bactérias potencialmente patogénicas no intestino (Flint et al., 2014; K. Wang et al., 2019; Blaak et al., 2020; Y. Silva et al., 2020).

Tanto o **acetato** como o **propionato** são mediadores anti-inflamatórios que inibem a libertação de citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos e neutrófilos, sendo que o propionato tem ainda um papel anti-neoplásico, uma vez que já demonstrou induzir apoptose nas células do carcinoma do cólon humano (Zafar & Saier, 2021). O **butirato**, em particular, é importante para a manutenção da saúde através da regulação do sistema imunológico, absorção de iões, diferenciação celular, manutenção da barreira epitelial, proteção contra doenças metabólicas, e, por conseguinte, melhoria da qualidade de vida (Canani et al., 2011; Liddicoat et al., 2020). Aumenta a expressão das proteínas das TJ no intestino e atua como a fonte de energia preferencial para as células epiteliais do cólon, diminui o pH luminal para

reduzir a solubilidade dos sais biliares, inibe a absorção de amoníaco, dificulta a invasão de microrganismos patogénicos e atua como um agente anti-inflamatório potente, alterando a secreção de mediadores pró-inflamatórios e reduzindo a hiper-permeabilidade intestinal (Kamo et al., 2017; Sanna et al., 2019; Guo et al., 2020; Blaak et al., 2020). O impacto dos SCFAs - em especial do butirato - nas TJ intestinais, já foi estudado, principalmente *in vitro* e em vários modelos animais experimentais (Zafar & Saier, 2021).

A Tabela 3 resume os SCFAs produzidos por algumas espécies bacterianas constituintes do microbioma intestinal, e a sua principal função.

Tabela 3: Produção de SCFAs por espécies bacterianas intestinais

Espécie bacteriana	SCFAs produzidos e o seu efeito	Referências
<i>Anaerostipes caccae</i>	Descrito como um dos maiores produtores de butirato da microbiota intestinal, utilizando o metabolismo dos hidratos de carbono, acetato e lactato. Graças a essa capacidade, é uma espécie que estabelece uma variedade de interações tróficas com muitas outras espécies, essenciais para a homeostase do intestino infantil, bem como participa na atenuação de respostas alérgicas à β -lactoglobulina, evitando o aparecimento de alergias alimentares no início de vida.	Schwartz et al., 2002; Abbeele et al., 2013; Belzer et al., 2017; Ose et al., 2018; L. Chia et al., 2018; Feehley et al., 2019; K. H. Lee et al., 2020; Turroni et al., 2020; L. Chia et al., 2020; Rachid et al., 2021
<i>Kineothrix alysoides</i>	Produtor de butirato intestinal, cujo aumento da abundância relativa se correlacionou com a redução do comportamento semelhante à ansiedade em ratinhos – propriedades ansiolíticas.	Haas & Blanchard, 2017; Sanna et al., 2019; Liddicoat et al., 2020
<i>Faecalibaculum rodentium</i>	Elevada capacidade de fermentação, especialmente produção de butirato ; isso contribui no controlo da acetilação de proteínas e da proliferação de células tumorais em humanos e ratinhos – função anti tumoral; regulação de várias vias metabólicas e diminuição de distúrbios metabólicos.	Chang et al., 2015; Ke et al., 2019; Perillo et al., 2020; Zagato et al., 2020

(Continua na página seguinte)

Tabela 3: Produção de SCFAs por espécies bacterianas intestinais (continuação)

Espécie bacteriana	SCFAs produzidos e o seu efeito	Referências
<i>Parabacteroides distasonis</i>	Capacidade de converter ácidos biliares primários em secundários e gerar succinato no intestino, o que conduz à diminuição da hiperglicemia e hiperlipidemia e melhoria da esteatose hepática; probiótico promissor que pode modular o metabolismo do hospedeiro para reduzir a obesidade e disfunções metabólicas; atenua a tumorigênese, modula marcadores inflamatórios e promove a integridade da barreira intestinal; propriedades anti-inflamatórias e anti-neoplásicas.	Y. Koh et al., 2018; K. Wang et al., 2019; G. Koh et al., 2020
<i>Barnesiella intestinihominis</i>	Contém genes para a produção de acetato, propionato e butirato ; tem a capacidade de alterar o microambiente tumoral em ratinhos, reduzindo as células T reguladoras e estimulando as respostas efectoras de linfócitos T citotóxicos anti tumorais, limitando os seus efeitos pró-apoptóticos diretos nas células epiteliais. Encontra-se diminuída em pacientes com síndrome do intestino irritável (SII) e tem um papel fundamental na inibição da taxa de crescimento do <i>Clostridium difficile</i> .	Steinway et al., 2015; Fielding et al., 2019; W. Li et al., 2019; Limeta et al., 2020; Jeffery et al., 2020
<i>Clostridium lactatifermentans</i>	Fermenta o lactato e produz acetato, propionato, isovalerato e butirato . Inibe o crescimento da <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis, em particular pela produção de propionato.	Wielen et al., 2002; Wielen et al., 2002; Flint et al., 2014; Jia et al., 2020

A maioria dos comensais do intestino desempenham um **papel duplo** no organismo hospedeiro, ou seja, para além de efeitos benéficos e protetores, através de elevadas atividades metabólicas e diversas funções intestinais e imunológicas, também possuem **efeitos indesejáveis e potencialidade de provocar inflamação e disbiose intestinal**. Esta condição é caracterizada particularmente pela redução da diversidade bacteriana e alteração da sua composição; redução da expressão de proteínas nas TJ intestinais e nos TLRs, alterando dessa forma a permeabilidade da barreira epitelial e conduzindo à libertação de citocinas pró-inflamatórias (Telle-Hansen et al., 2018; Ashrafian et al., 2019; Sitkin & Pokrotnieks, 2019).

A Tabela 4 sintetiza algumas consequências provocadas pela colonização de espécies bacterianas com esse tipo de potencialidade.

Tabela 4: Potencialidade inflamatória das espécies bacterianas

Espécie/estirpe	Potencialidade inflamatória e fatores de virulência	Referências
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	A fucose livre que induz nos enterócitos, ou o ácido siálico, podem ser usados como fonte de carbono por outros microrganismos patogênicos, por exemplo, <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium ou <i>Clostridium difficile</i> .	Grondin et al., 2017; Catlett et al., 2020
	Aumenta a expressão do gene de virulência da <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica através do fator de transcrição Cra → contribui para a proliferação desse microrganismo entérico.	Curtis et al., 2015
	Produz vesículas da membrana externa (OMVs) que contêm fosfatases e sulfatases, podendo contribuir para o meio inflamatório do intestino.	Durant et al., 2020
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	A colonização desta espécie em ratos, que tinham deficiência de esfingolípídeos, conduziu a pools de ceramida intestinal alterados e características clínicas de inflamação intestinal.	Hiippala, 2020
<i>Staphylococcus lentus</i>	Microrganismo patogênico oportunista para pacientes imunocomprometidos pela produção de inúmeros fatores de virulência. Por exemplo, as enterotoxinas que produz são agentes causadores de intoxicações alimentares, sendo também capazes de interromper as respostas imunológicas humanas e animais.	Podkowik et al., 2013; Al-Talib et al., 2020; Michalik et al., 2020
	Induz a transcrição de genes pró-inflamatórios do hospedeiro, que provocam alterações no transcriptoma e ambiente intestinal fetal, bem como a alterações no intestino adulto.	Jašarević et al., 2018
	Causador frequente de mastite, com o aumento de citocinas séricas, incluindo IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral α (TNF- α).	Tao et al., 2020
	Capacidade de adesão às células HT-29 (linha cancerígena do cólon humano).	Luqman et al., 2018

(Continua na página seguinte)

Tabela 4: Potencialidade inflamatória das espécies bacterianas (continuação)

Espécie/estirpe	Potencialidade inflamatória e fatores de virulência	Referências
<i>Bacillus cereus</i>	Causa importante de intoxicação alimentar em humanos, associado a 2 tipos de doenças gastrointestinais, emética (intoxicação) e síndrome diarreica (infecção).	Andersson et al., 2007; Jeßberger et al., 2014; Tuipulotu et al., 2020
	Fatores de virulência: toxinas formadoras de poros, cereulida, hemolisinas, enterotoxinas, proteases e fosfolipases - danificam as células epiteliais próximas pela formação de poros, resultando em danos às microvilosidades e lise osmótica das células epiteliais do hospedeiro.	Duport et al., 2016; Tuipulotu et al., 2020
	Encontrado em estudos de microbioma do leite materno, implicado em infecções graves ou fatais em bebês prematuros.	Egan et al., 2021
	Elevada capacidade de colonização no ambiente intestinal. Capacidade de aderir à mucina gástrica e degradá-la.	Duport et al., 2016; Jessberger et al., 2020
	Produz aminas biogênicas, que são tóxicas para a linha celular intestinal HT-29.	K. Lee et al., 2019
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Emergente microrganismo patogênico humano oportunista global e nosocomial, resistente a múltiplos antibióticos.	Brooke, 2012; An & Berg, 2018; E. J. Kim et al., 2019
	Fatores de virulência: síntese de enzimas extracelulares (proteases, lipases e lecitinase), biofilmes, formação de cápsula, motilidade bacteriana e <i>quorum sensing</i> .	Adegoke et al., 2017; Klimkaité et al., 2020
	Pode afetar todo o processo de interação imunológica, provocando exaustão dos linfócitos T e segregação de uma grande quantidade de citocinas IL-2, interferon gama (IFN- γ) e TNF- α → efeito inibitório na imunidade celular.	M. Wang et al., 2021
<i>Clostridium lactatifermentans</i>	Espécie caracterizada como bactéria 'condutora' da inflamação, aumentada em grupos inflamatórios e de hiperproliferação, num estudo das mudanças biológicas evolutivas da microbiota intestinal na progressão tumoral do epitélio normal do cólon.	Sun et al., 2017 Garza et al., 2020

(Continua na página seguinte)

Tabela 4: Potencialidade inflamatória das espécies bacterianas (continuação)

Espécie/estirpe	Potencialidade inflamatória e fatores de virulência	Referências
<i>Clostridium lactatifermentans</i>	Espécie caracterizada como bactéria 'condutora' da inflamação, aumentada em grupos inflamatórios e de hiperproliferação, num estudo das mudanças biológicas evolutivas da microbiota intestinal na progressão tumoral do epitélio normal do cólon.	Sun et al., 2017 Garza et al., 2020
<i>Dorea longicatena</i>	Associada à degradação da mucina, aumentando potencialmente a permeabilidade intestinal.	Schirmer et al., 2016; Worth, 2020
	Associada principalmente à doença de Crohn e SII - aumentada na mucosa do íleo terminal de indivíduos que sofrem de recorrência pós-operatória dessa patologia.	Mondot et al., 2016; Worth, 2020; Z. Wang et al., 2020
	Capacidade de aderir às células cancerosas, capacidade oportunista e potencial papel carcinogénico.	J. Yang et al., 2019
	Associada a respostas imunes exacerbadas, acompanhadas pela produção anormal de citocinas inflamatórias, incluindo níveis mais altos de IFN- γ .	Schirmer et al., 2016
	Negativamente associada à manutenção de um intestino saudável.	Mortaş et al., 2020
<i>Clostridium bolteae</i> BAA613	Possibilidade de comprometer o funcionamento intestinal através da produção de metabólitos neurotóxicos na chamada conexão intestino-cérebro.	Pequegnat & Monteiro, 2019
	Causa infecções intra-abdominais quando a barreira intestinal natural é alterada. Ex: episódios diarreicos crónicos.	Dehoux et al., 2016

Desta forma, é fácil perceber que a importância da microbiota intestinal tem sido compreendida gradualmente por investigadores nos últimos anos devido ao desenvolvimento da metagenómica, que permitiu a identificação de vários microrganismos, bem como a sua relação com hospedeiros e várias patologias. **A microbiota intestinal pode frequentemente**

afetar vários sistemas do corpo humano, principalmente através **(i)** da produção de metabolitos ou da mediação de várias citocinas; **(ii)** do desenvolvimento do sistema imunológico para aumentar a resistência à infecção, segregar antigénios para combater microrganismos patogénicos e induzir células T na mucosa intestinal a formar células imunorreguladoras para inibir a inflamação (Lu et al., 2020). Portanto, continua a ser de extrema importância a interpretação e compreensão de vários estudos baseados nas variações interindividuais, heterogeneidade das comunidades bacterianas ao longo, e através do TGI, e a necessidade de distinguir as causas da disbiose, ou seja, conhecer as particularidades das espécies bacterianas que coabitam o nosso microbioma intestinal (Thursby & Juge, 2017).

2.4. Micotoxinas

Os fungos têm sido observados há milénios e são encontrados relativamente de forma omnipresente na natureza, contendo esporos capazes de viajar grandes distâncias pela superfície do planeta. Muitos produtos agrícolas importantes, especialmente aqueles ricos em hidratos de carbono, são locais preferenciais de colonização para estes eucariotas. Alguns metabolitos tóxicos produzidos durante o seu crescimento são denominados como **micotoxinas** e podem contaminar diversos produtos agrícolas (De Ruyck et al., 2015). Assim, estas são um grupo de metabolitos não enzimáticos e de baixa massa molecular (≈ 700 Da), segregados por organismos fúngicos, na sua maioria pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium*. Várias espécies de fungos pertencentes a esses géneros podem produzir micotoxinas sendo as principais: desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, fumonisina B1, aflatoxina B1 e patulina. Os fungos costumam desenvolver-se bem em ambientes com elevada humidade, temperatura e oxigénio durante todas as fases de produção e armazenamento da planta. Chulze (2010) relatou que os principais fatores que influenciam o crescimento de fungos, em produtos alimentícios armazenados, são o teor de humidade, mais precisamente, a atividade da água (a_w) e a temperatura da mercadoria, embora varie muito entre géneros fúngicos (Chulze, 2010).

As micotoxinas estão presentes numa variedade de alimentos para animais, incluindo concentrados, forragens verdes, feno e silagens, principalmente por terem capacidade de resistir a temperaturas muito elevadas, conseguindo persistir em muitos tipos de alimentos processados (Ogunade et al., 2018). A produção destes contaminantes pelos fungos depende

das fontes de alimentos, dos enzimas específicos do fungo e de outros fatores ambientais. Normalmente, a produção das micotoxinas aumenta durante o processamento dos alimentos, durante práticas de colheita inadequadas, armazenamento impróprio, condições aquém das ideais durante o transporte, bem como a sua comercialização (Taheur et al., 2017).

Os humanos são expostos diretamente a estes metabolitos tóxicos através do consumo de alimentos derivados de plantas contaminadas (designada micotoxicose primária) quando os produtos agrícolas são colonizados por fungos micotoxigênicos ou, indiretamente, pelo consumo de produtos derivados de animais quando estes são alimentados com ração contaminada (designada micotoxicose secundária) (Taheur et al., 2017; Anal et al., 2021). Assim, devido à natureza ubíqua dos fungos, estes metabolitos têm sido uma preocupação recorrente das organizações de saúde, onde a sua permanência em alimentos e rações não pode ser ignorada e já representa um risco para os consumidores e animais, respetivamente (Liew & Mohd-Redzwan, 2018).

2.4.1. Interação das micotoxinas com a microbiota e com o trato gastrointestinal

O epitélio intestinal é a primeira linha de defesa física, química e biológica do hospedeiro, como ilustrado na Figura 5 e, portanto, desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase intestinal sob stress de exposição a micotoxinas (Grenier & Applegate, 2013). O TGI é o órgão responsável pela ingestão de alimentos, digestão, absorção de energia e nutrientes, resposta imunológica, bem como a eliminação de produtos residuais (Ren et al., 2019). A barreira intestinal resulta da sinergia entre três componentes: **(i)** a barreira ligada à microbiota que coloniza o intestino; **(ii)** a barreira físico-química formada pelas células epiteliais e as suas secreções; e **(iii)** a barreira imunológica (Guerre, 2020). Assim, manter este órgão saudável é crucial, pois garante que os nutrientes sejam absorvidos de forma ideal, fornece proteção eficiente contra microrganismos patogênicos através do seu próprio sistema imunológico e mantém a microbiota indígena em números adequados, e confinada às suas estirpes naturais. Essas três funções do TGI sugerem que cada componente interage entre si (nutrição ↔ sistema imunológico ↔ microbiota intestinal) para manter a homeostase intestinal (Grenier & Applegate, 2013).

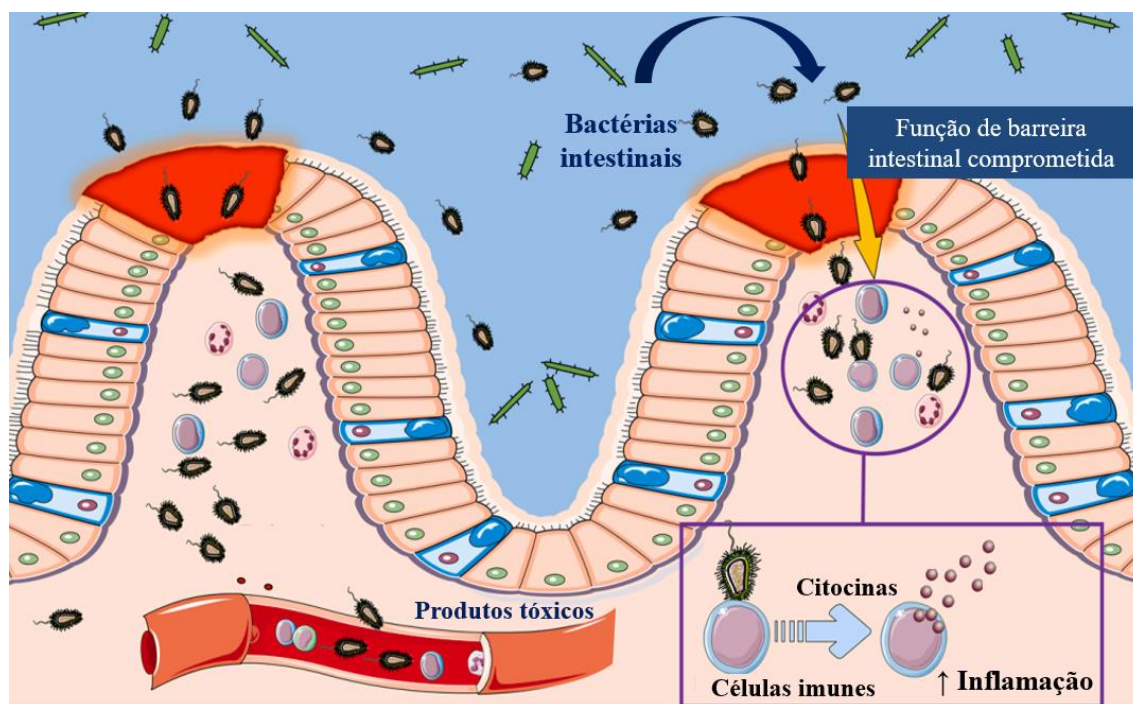


Figura 5: A função da barreira intestinal (adaptado de Lu et al., 2020)

Como as micotoxinas estão presentes principalmente em alimentos e rações, o intestino é o primeiro alvo para a sua toxicidade, e, igualmente o local da sua absorção que leva à exposição sistêmica a esses compostos. Existem, portanto, **inúmeras razões para estudar a interação bidirecional que existe entre as micotoxinas e a microbiota intestinal**, em primeiro lugar, porque os microrganismos intestinais têm capacidade de modificar a toxicidade destes contaminantes, maioritariamente através da: **(i)** alteração na toxicocinética das micotoxinas; **(ii)** transformação química por enzimas presentes nas células do microrganismo, ou que foram libertadas por este no intestino; **(iii)** hidrólise, acetilação, descarboxilação e biotransformação das micotoxinas, que conduz à formação de metabolitos menos tóxicos do que o composto original; **(iv)** capacidade que alguns microrganismos têm, principalmente pela constituição da sua parede celular, de se ligarem às micotoxinas, reduzindo assim a sua absorção (Guerre, 2020). No entanto, o interesse no estudo desta interação também provém da **capacidade que as micotoxinas têm de alterar a composição da microbiota intestinal**, cujos efeitos tóxicos provocam alterações nas secreções e muco intestinal, nas células do sistema imunológico e na composição do ambiente de crescimento dos microrganismos comensais que, conseqüentemente, altera o equilíbrio da população e

pode conduzir à disbiose, translocação bacteriana e aparecimento de doenças infecciosas (Guerre, 2020; Anal et al., 2021).

Relativamente à **interação das micotoxinas com o TGI**, a atenção gera-se normalmente apenas sobre os seus efeitos pós-absorção, quer se manifestem em sinais crónicos ou agudos. De facto, esta é uma importante monitorização do impacto que as micotoxinas têm no ambiente intestinal pois estes contaminantes têm biodisponibilidades muito variáveis. Ou seja, algumas serão absorvidas mais rapidamente, enquanto outras irão avançar no TGI, e isso é muito importante por várias razões. Em primeiro lugar, sejam ou não absorvidas na circulação sistémica, as células do TGI estarão potencialmente expostas a toda a gama de micotoxinas ingeridas e nas maiores concentrações, sendo o primeiro alvo desses contaminantes. Em segundo lugar, as toxinas que avançam no TGI terão maior oportunidade de interagir com as células microbianas presentes no intestino. O rápido aparecimento da maioria das micotoxinas na circulação indica claramente que a maior parte da toxina ingerida é absorvida na parte proximal do TGI. Posto isto, estes contaminantes podem comprometer o epitélio intestinal antes da absorção na parte superior, ou em todo o intestino (Broom, 2015).

As evidências indicam que as principais micotoxinas afetam marcadamente as células epiteliais (Fig.6) através de vários **mecanismos**, nomeadamente:

- (i) aumento da morte celular e citotoxicidade;
- (ii) aumento da permeabilidade da monocamada celular;
- (iii) diminuição da TEER;
- (iv) expressão, localização intracelular e função das proteínas TJ comprometidas;
- (v) translocação subsequente de fatores de stress prejudiciais, em particular bactérias (comensais e patogénicos), do lúmen intestinal para o ambiente interno;
- (vi) camada de muco do epitélio intestinal mais fina (Grenier & Applegate, 2013).

Os efeitos negativos das micotoxinas na saúde intestinal incluem ainda uma diminuição na síntese de proteínas, o que reduz a barreira e a função imunológica; o aumento do stress oxidativo a nível celular; alterações na expressão génica e na produção de mensageiros químicos (citocinas), com efeitos no sistema imunológico, no crescimento e diferenciação

celular; e ainda a indução de morte celular programada (apoptose) (Caballero & Mazili, 2020).

Para além disso, já foi anteriormente demonstrado que a presença destes metabolitos pode causar alterações na estrutura das vilosidades intestinais; o seu encurtamento não só aumenta a permeabilidade intestinal, mas também diminui a área de superfície para a absorção de nutrientes, levando à sua má absorção, diarreia e aumento da suscetibilidade a doenças (W. Zhang et al., 2020). O comprometimento desta barreira intestinal resulta na penetração de xenobióticos de diferentes pesos moleculares e translocação bacteriana, acabando por contribuir para um desequilíbrio das respostas inflamatórias e a ativação da imunidade local e sistémica, causando a ocorrência de patologias inflamatórias (Gao et al., 2020).

Por outro lado, algumas micotoxinas também podem estimular a produção de várias moléculas antimicrobianas, que têm efeitos positivos na manutenção da homeostase intestinal. Por exemplo, sabe-se que as Fumonisinias podem inibir o crescimento de fungos, incluindo *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*; algumas toxinas produzidas pelo género *Fusarium* podem exibir diferentes mecanismos de defesa antimicrobianos e as Aflatoxinas exibem atividade antimicrobiana moderada contra as espécies bacterianas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter aerogenes* (Du et al., 2017).

O metabolismo destes contaminantes alimentares pode ocorrer tanto no fígado como no trato digestivo. Ao nível intestinal, o epitélio ou os microrganismos comensais podem limitar os efeitos tóxicos das micotoxinas no TGI. Isso é especialmente verdadeiro nos ruminantes por serem capazes de converter muitas micotoxinas em metabolitos não tóxicos. No entanto, em não ruminantes, a biotransformação intestinal das micotoxinas ocorre predominantemente no intestino grosso e, portanto, ocorre menor desintoxicação antes da absorção (Gao et al., 2020).

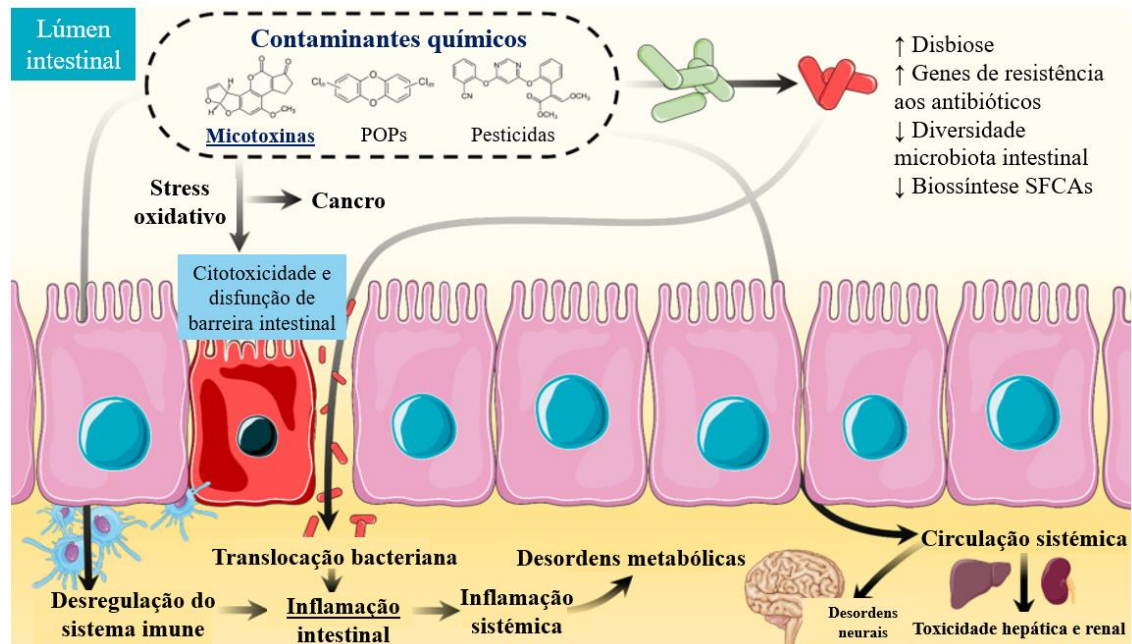


Figura 6: Interação das micotoxinas com o lúmen intestinal (adaptado de Lu et al., 2020)

2.4.2. Efeitos tóxicos e sintomatologia

Micotoxicose é o termo usado para a intoxicação associada à exposição humana ou animal a micotoxinas, ocorrendo esta principalmente por ingestão, mas também, eventualmente, por via dérmica e inalatória. As micotoxinas podem ser tóxicas a concentrações muito baixas e o seu **efeito tóxico** pode ocorrer ao nível da célula, tecido e órgão causando efeitos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos, imunossupressores e estrogénicos (De Ruyck et al., 2015; Du et al., 2017). A extensão dos efeitos adversos das micotoxinas na saúde humana ou animal depende principalmente do tempo de exposição, dosagem, tipo de micotoxinas, estado fisiológico e nutricional, bem como possíveis efeitos sinérgicos com a exposição a outros produtos químicos. Também é importante realçar que a exposição a estes compostos não se limita apenas àquelas que são puras, mas também as que são conjugadas a biopolímeros; portanto, raramente aparecem de forma isolada. Algumas pessoas são mais suscetíveis a contrair micotoxicose do que outras, e isso deve-se à variabilidade farmacogenética em que mutações genéticas específicas, como genes do citocromo P450, podem aumentar ou

diminuir a atividade metabólica/citotoxicidade das micotoxinas (Liew & Mohd-Redzwan, 2018). Quando os animais são alimentados com dietas contaminadas com estes metabolitos secundários, é frequente ocorrer redução do consumo de ração e produção de leite, problemas reprodutivos, imunossupressão e morte (Ogunade et al., 2018). No que diz respeito aos humanos, os principais **sintomas** incluem perda de peso corporal, alterações neuroendócrinas, má absorção de nutrientes e possível diarreia, inflamação e até mesmo a morte.

Assim, é importante conduzir estudos relacionados à sua **desintoxicação**. Atualmente, a estratégia mais comum para reduzir a exposição dos animais às micotoxinas é diminuir a sua biodisponibilidade incorporando vários agentes desintoxicantes de micotoxinas na ração, que visam a redução da sua captação e distribuição para o sangue e órgãos-alvo. Dependendo do seu modo de ação, esses aditivos nas rações podem atuar reduzindo a biodisponibilidade das micotoxinas (agentes adsorventes, ex: carvão ativado, minerais de silicato) ou degradando-os em metabolitos menos tóxicos (agentes de biotransformação, ex: enzimas produzidas por algumas espécies bacterianas) (Laurain et al., 2018).

2.5. Aflatoxinas

As aflatoxinas são um dos principais metabolitos fúngicos secundários produzidos por fungos do género *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, embora outras espécies que produzem aflatoxinas em alimentos também tenham sido identificadas, como *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* ou *A. australis*. Estes metabolitos são uma família de compostos geralmente classificados como difuranocumarinas (Marchese et al., 2018) e foram descobertos no final da década de 1950 e início da década de 1960, como resultado de uma investigação conduzida para avaliar a elevada taxa de mortalidade em aves, e outros animais, em consequência da ingestão de ração contendo amendoim originário da América do Sul. As aflatoxinas mais relevantes em termos de segurança alimentar são a B1 e B2 (produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*), G1 e G2 (produzidas por *A. parasiticus*) e M1 e M2 (metabolitos das aflatoxinas B1 e B2 que são excretados no leite) (Losada et al., 2011). *A. flavus* é encontrado de forma omnipresente no solo e contamina uma ampla variedade de culturas do mundo, como arroz, milho, amendoim,

grãos, nozes, laticínios, chá, especiarias e cacau, bem como rações para animais e peixes (Negash, 2018).

As aflatoxinas são especialmente problemáticas em climas quentes e secos e a sua prevalência é agravada pelo stress ou danos devido à seca antes da colheita, a atividade dos insetos, um mau momento da colheita, as fortes chuvas durante e após a colheita e uma secagem inadequada da cultura antes do armazenamento. A FAO (*Food and Agriculture Organization*) relata, anualmente, que cerca de 20% dos alimentos produzidos no mundo estão contaminados por micotoxinas, sendo que as aflatoxinas são maioritárias. Alguns fatores essenciais que afetam a contaminação por aflatoxinas incluem o clima da região, o genótipo da cultura plantada, o tipo de solo, as temperaturas mínimas e máximas diárias e a evaporação líquida diária (Negash, 2018).

Os **sintomas** associados à ingestão aguda de aflatoxinas (aflatoxicose) incluem inapetência, ataxia e hepatomegália; no entanto, o diagnóstico desta patologia é difícil porque os sintomas são inespecíficos (Ogunade et al., 2018). A prevalência de doenças oncológicas e outras em explorações pecuárias, sistema imunológico debilitado dos animais e a redução na produção de leite são alguns exemplos de danos na indústria de alimentos e pecuária. Considerando as enormes perdas económicas e a proteção da saúde pública, a prevenção e neutralização das aflatoxinas na alimentação das espécies pecuárias e produtos de origem animal, como o leite, é essencial. Assim, alguns países estabeleceram **níveis máximos permitidos de aflatoxinas** em alimentos – dependendo do desenvolvimento dos vários países - com o objetivo de controlar e reduzir os seus efeitos prejudiciais. Por exemplo, os níveis máximos definidos pela Comissão Europeia são 2 µg/kg para a AFB1 e 4 µg/kg de peso corporal para aflatoxinas totais, nos cereais e nozes para consumo humano. Suspeita-se que o consumo de alimentos contendo concentrações de aflatoxina de 1 mg/kg, ou superior, cause aflatoxicose; com base em estudos anteriores, estimou-se que, uma dose de 20 a 120 µg/kg de peso corporal consumida por um período de 1 a 3 semanas, é extremamente tóxica e potencialmente letal (Wild et al., 2015).

2.5.1. Aflatoxina B1

A **aflatoxina B1** é uma das principais toxinas e um dos carcinogénicos naturais mais potentes produzido por espécies toxigénicas de *Aspergillus*, tendo sido classificada como cancerígeno humano do Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (J. Wang et al., 2016), uma vez que se destaca do ponto de vista da segurança sanitária por ser a mais comum em alimentos e também a mais tóxica para o homem, de entre mais de 14 diferentes tipos de aflatoxinas (Galarza-Seeber et al., 2016; Marchese et al., 2018).

Esta toxina é classificada como uma difuranocumarina, caracterizada pela fusão de um anel ciclopentenona ao anel lactona da estrutura cumarínica (Fig.7) e por forte emissão de fluorescência na região azul (daí a designação B) quando exposta à luz ultravioleta. Relativamente às suas **propriedades químicas**, é ligeiramente solúvel em água, insolúvel em solventes apolares e muito solúvel em solventes orgânicos polares. Possui forte estabilidade térmica, mesmo em elevadas temperaturas (> 100 °C), o que evita que seja degradada termicamente durante a fabricação de alimentos. Isso representa um grande obstáculo na redução da contaminação de alimentos pela AFB1, especialmente em leite e derivados, uma vez que, isoladamente, a pasteurização e outros tratamentos térmicos já se mostraram pouco eficazes. Os seus **efeitos** no organismo estão intimamente relacionados à sua estrutura química, podendo ser classificados genericamente como carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos e imunossupressores (Losada et al., 2011).

É uma molécula relativamente pequena e lipofílica, tornando-a eficientemente absorvida pelo TGI após administração oral, principalmente no intestino delgado por difusão passiva, e mais eficiente no duodeno, prejudicando o crescimento celular, causando danos ao DNA e aumentando a atividade da lactato desidrogenase. A **absorção** desta micotoxina no intestino delgado é considerada completa porque vários estudos, utilizando diversas espécies, mostraram uma toxicocinética semelhante da AFB1 após administração oral em comparação com intraperitoneal ou intravenosa. Embora a sua passagem pelo TGI seja eficiente, é relativamente lenta, o que provavelmente se deve ao extenso metabolismo da micotoxina nos tecidos do intestino; ela é absorvida, bem como os seus metabolitos, e são transportados para o fígado, onde ocorre metabolismo posterior (J. Wang, 2017).

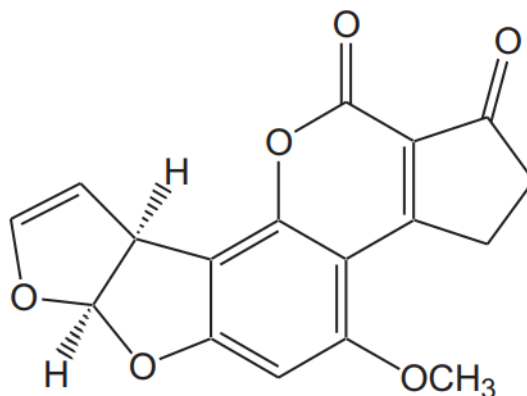


Figura 7: Estrutura AFB1 (adaptado de Gutierrez, 2015)

Assim, o fígado é o principal órgão-alvo da AFB1, e, por este motivo, pode também ser ativada metabolicamente nesse órgão para causar toxicidade hepática aguda, formar aductos no DNA e induzir mutações genéticas (J. Wang et al., 2016).

A AFB1 é metabolizada neste órgão, pelo sistema de enzimas P450, em aflatoxina B1-8,9-epóxido (AFBO), que tem dois isômeros: AFB1-8,9-exo-epóxido e AFB1-8,9-endo-epóxido. Esta conversão metabólica é realizada principalmente no fígado humano pelos citocromos CYP3A4 e CYP1A2. Em elevadas concentrações de AFB1, CYP3A4 é o maior produtor de AFBO, produzindo essencialmente apenas o seu exo isômero. A natureza altamente eletrofílica desse intermediário permite que ele reaja espontaneamente com aminas biológicas em proteínas e ácidos nucleicos. Ao reagir com o DNA, AFBO liga-se covalentemente na posição N₇ da guanina, formando o aducto AFB1-N₇-guanina. O exo isômero que se forma, AFB1-exo-8,9-epóxido, é considerado o principal metabólito carcinogénico da AFB1 (Rushing & Selim, 2019). Assim, esta micotoxina é um teratogénico potente devido à sua capacidade de se ligar ao DNA e de causar a conversão de guanina em timina (G→T) na proteína supressora de tumor p53, o que conduz a mutações e transformações malignas; subsequentemente, é inibida também a síntese de proteínas (De Ruyck et al., 2015; Smith et al., 2017; Liew & Mohd-Redzwan, 2018).

Os **efeitos biológicos**, produzidos como uma resposta ao consumo de AFB1, vão depender da variação entre espécies, idade, sexo, estado nutricional, os componentes dos alimentos, a interação com as substâncias químicas, a dose e o período de exposição do organismo à aflatoxina (Losada et al., 2011). A AFB1 presente na **alimentação dos animais**

causa problemas nos tratos genital, digestivo e respiratório através de diversos mecanismos, como interferência no metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos; provoca apoptose celular, redução da síntese proteica e instabilidade da membrana das células. Esta micotoxina é igualmente um agente causador da supressão do crescimento, modulação do sistema imunológico e desnutrição. Exerce inúmeros efeitos imunotóxicos, variando de alterações na imunidade inata ou células apresentadoras de antigénios a alterações na imunidade adaptativa, resultando num número reduzido de linfócitos circulantes, na inibição da blastogénese de linfócitos e a alteração da expressão de citocinas em animais de várias espécies, aumentando assim o risco de doenças infecciosas (Losada et al., 2011). Como já referido, elevadas concentrações desta micotoxina são letais, concentrações médias levam ao envenenamento crónico, e a exposição contínua, a baixas concentrações, pode resultar em **carcinoma hepatocelular** (Negash, 2018). Os **biomarcadores** utilizados para medir e identificar a exposição à aflatoxina B1 estão quantitativamente associados à ingestão alimentar desta, e incluem os aductos AFB1-N₇-guanina excretados na urina, que refletem a exposição do dia anterior; aflatoxina M1, o metabolito resultante da hidroxilação da AFB1, encontrado no leite materno, que reflete a exposição de 12 a 24h após a ingestão de alimentos contaminados; e o aducto aflatoxina-albumina no plasma ou soro, com semi-vida de aproximadamente 2 meses, o que permite a medição de exposições crónicas à aflatoxina (Gong et al., 2016).

Devido à elevada prevalência da AFB1 nos alimentos, muitas estratégias têm sido desenvolvidas para prevenir ou **remover a contaminação**, a fim de restaurar a segurança e comestibilidade dos produtos alimentícios. As estratégias de controlo são divididas em técnicas pré e pós-colheita. As primeiras incluem o uso de culturas geneticamente modificadas que são resistentes à infecção pelo género *Aspergillus* e fatores de stress ambientais, rotação de culturas e o tempo de cultivo. As segundas incluem métodos físicos, como secagem, embalagem, armazenamento e utilização de pesticidas ou outros aditivos químicos/biológicos adequados. Essas estratégias atuam como medidas preventivas para reduzir a contaminação nas culturas, no entanto, não são eficazes na sua prevenção total (Rushing & Selim, 2019). Existem igualmente leveduras e várias **bactérias lácticas** que se podem ligar às aflatoxinas, diminuindo a sua biodisponibilidade em rações ou alimentos, utilizando essencialmente o mecanismo de **bioadsorção** para esse efeito. Como as bactérias

láticas contribuem fortemente para a manutenção e promoção da saúde corporal, através de (i) redução do pH no TGI; (ii) secreção de compostos antimicrobianos (bacteriocinas) (iii) aumento da função imunológica e (iv) prevenção da aderência patogénica e colonização no TGI, são as espécies mais testadas e mais utilizadas como probióticos e geralmente são consideradas seguras, sendo um método desejável para a remoção destes contaminantes (Jin et al., 2021).

Estudos realizados recentemente demonstraram que essa capacidade de adsorção às aflatoxinas envolve a adesão física direta, por um curto período de tempo, da micotoxina aos peptidoglicanos na parede bacteriana de algumas bactérias lácticas, por interações não covalentes incluindo interações de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogénio (Losada et al., 2011; Guerre, 2020). Entre estas bactérias, a adsorção física pelo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* Shirota têm sido as mais estudadas, embora *Enterococcus faecium* e outras bactérias Gram (+) pertencentes aos géneros *Bifidobacteria*, *Rhodococcus*, *Cellulosimicrobium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* e *Actinomycete*, e várias bactérias Gram (-) pertencentes aos géneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Mycobacterium*, entre outros, também tenham sido descritas como eficazes na desintoxicação da AFB1; as espécies fúngicas incluem *Candida utilis*, *Rhizopus* spp., *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp., *Phoma* spp., *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* (Losada et al., 2011; Guerre, 2020).

Curiosamente, foi descrito que a espécie *Armillariella tabescens*, um fungo comestível e medicinal chinês, exhibe atividades desintoxicantes contra a AFB1 por produzir o enzima aflatoxina oxidase, com capacidade de reduzir consideravelmente a toxicidade mutagénica da AFB1, tendo como alvo a ligação insaturada carbono-carbono-8,9 deste contaminante alimentar (Cao et al., 2011; Anal et al., 2021).

A Tabela 5 sistematiza alguns estudos acerca do potencial de adsorção/degradação de algumas espécies bacterianas relativamente à AFB1.

Tabela 5: Potencial de degradação da AFB1 pelas espécies bacterianas

Espécie/estirpe	Modelo em estudo e [AFB1]	Potencial de degradação	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	Vários modelos animais [AFB1] = 10 µg/mL	Diminuição substancial dos tamanhos das culturas bacterianas em 4 dias, mas o mesmo não aconteceu em 8 dias. Na cultura de <i>B. cereus</i> , o tamanho da colônia foi aumentada por esta micotoxina após 8 dias da inoculação. Sugere-se que essas bactérias eventualmente degradem a aflatoxina, resultando, com o tempo, numa densidade das colônias bacterianas normais e aumentadas.	Weekley et al., 1989 Bernardeau et al., 2017
<i>Bacillus cereus</i> MG751322	Cavalo, pombo, ovelha e búfalo [AFB1] = 500 ppb	Forte capacidade de degradar a AFB1, sendo a percentagem de degradação de 98% após 24h de incubação, com T ótima de 37 °C. Potencial espécie bacteriana para ser utilizada em biorremediação e desintoxicação de aflatoxinas a nível alimentar.	Abdel-Shafi et al., 2018
<i>Bacillus cereus</i> RC3E, RC4A, RC6B, RC1C, RC3A, RC3C, RC4B, RC6A, RC1A, RC1B e RC3B	Artemia salina [AFB1] = 1000 ng/mL	Conhecidas por produzir N-acil homoserina lactona (AHL) lactonases que podem hidrolisar a ligação éster do anel de lactona da AFB1. A degradação desta pelas estirpes RC3E, RC4A e RC6B aumentou progressivamente de 24 a 72 h. As estirpes RC1C, RC3A, RC3C, RC4B e RC6A atingiram o seu máximo de degradação em 72 h, enquanto para RC1A, RC1B e RC3B a degradação máxima foi alcançada em 48 h. As % de degradação variaram de 32,72 a 67,83 ng/ml em 72 horas. As estirpes RC1A, RC3B, RC4A, RC4B e RC3E apresentaram % de degradação significativamente maiores nas primeiras 24-48 h.	González Pereyra et al., 2019

(Continua na página seguinte)

Tabela 5: Potencial de degradação da AFB1 pelas espécies bacterianas (continuação)

Espécie/estirpe	Modelo em estudo e [AFB1]	Potencial de degradação	Referência
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (isolado 35-3)	Anta [AFB1] = 100 ng/mL	Ocorreu ↓ da AFB1 em 82,5% após incubação em meio líquido a 37 °C por 72h. Acredita-se que a degradação enzimática da micotoxina sem pré-exposição é uma atividade constitutiva da bactéria.	Guan et al., 2008
<i>Lactobacillus sp.</i>	N/A	2×10^{10} UFC/mL de <i>Lactobacillus sp.</i> é capaz de reduzir o nível de AFB1 para 0,1–13%. Parece que os componentes da superfície destas bactérias probióticas estão envolvidos na ligação à micotoxina, e por isso, a intervenção com este microrganismo, é potencializada para atenuar a toxicidade induzida pela AFB1.	Liew et al., 2019
<i>Lactobacillus murinus</i>	Borrego e rato [AFB1] = 5 µg/ml	Revelou ter capacidade antifúngica principalmente a pH 4. Inibiu o crescimento de <i>Aspergillus niger</i> e de <i>Aspergillus flavus</i> em 25,3 e 32,6 %, respetivamente.	Drobná et al., 2017
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CSCC 5142	Solução contaminada com [AFB1] = 5 µg/ml	Demonstrou ter 30,1% de capacidade de ligação à AFB1.	Peltonen et al., 2001
<i>Staphylococcus lentus</i>	Sorgo e amendoim [AFB1] = 100 ng/g	Nas concentrações de 10 e 25 mL kg ⁻¹ impediu completamente o crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> em sorgo e amendoim, respetivamente, e consequentemente, não foi produzida aflatoxina. Portanto, tem a capacidade de inibir o crescimento destas espécies fúngicas a 100% e ainda demonstrou degradar a AFB1 em 96%.	Abdelkader et al., 2020

2.5.2. Influência da AFB1 no intestino e no microbioma intestinal

Nos últimos anos, a aplicação de **tecnologias de sequenciação de DNA de nova geração** (NGS) tem permitido descobrir e compreender inúmeras relações que se estabelecem entre a microbiota intestinal, a composição da dieta e a saúde do hospedeiro. Nesta relação, a exposição a micotoxinas ou composição da dieta pode levar à alteração da microbiota intestinal, e esta, por sua vez, pode influenciar significativamente o estado de saúde do hospedeiro (Yin et al., 2016).

Relativamente ao seu **efeito no intestino**, atualmente os estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* revelam que a AFB1 provoca tanto alterações na estrutura morfológica do intestino (redução da densidade das vilosidades jejunais e a área de absorção intestinal, redução das microvilosidades nos enterócitos, desaparecimento das cristas mitocondriais etc.), como alterações na barreira imunológica da mucosa intestinal, provocando redução da função imune humoral e redução dos níveis de expressão de mRNA de várias imunoglobulinas (Liew & Mohd-Redzwan, 2018). Já diversos estudos tentaram compreender as consequências da exposição à AFB1 em várias linhagens celulares, relacionadas ao intestino, estando alguns exemplos representados na Tabela 6.

Tabela 6: Efeitos da AFB1 no intestino

Modelo em estudo e [AFB1]	Efeitos da AFB1 no intestino	Referência
Células Caco-2 ; [AFB1] = 1–50 μ M	Diminuição da viabilidade celular.	Nones et al., 2017
Células Caco-2 ; [AFB1] = 0,01–1 μ g/mL	Inibição significativa do crescimento de células indiferenciadas e diferenciadas; aumento da LDH e ocorrência de danos genéticos de uma maneira dependente do tempo e da dose, possivelmente devido à produção de ROS. As células diferenciadas mostraram-se mais sensíveis à aflatoxina, o que pode ser devido à alteração das enzimas durante a diferenciação celular.	J. Zhang et al., 2015

(Continua na página seguinte)

Tabela 6: Efeitos da AFB1 no intestino (continuação)

Modelo em estudo e [AFB1]	Efeitos da AFB1 no intestino	Referência
Camarão branco pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) Tecido intestinal e do hepatopâncreas; [AFB1] = 5 ppm	Aumento da mortalidade, diminuição da taxa de ganho de peso, destruição grave da histomorfologia do hepatopâncreas e do intestino, resultando em danos ao sistema imunológico dos camarões. Também afetou a expressão da sIgA e do seu recetor, afetando assim o seu transporte em células epiteliais para as camadas de muco.	Y. Wang et al., 2019
Frango; [AFB1] = 40 µg/kg	Diminuição do nível de transcrição de sIgA; aumento na concentração de diamina oxidase sérica; diminuição do nível de mRNA de ocludina e claudina-1 no jejuno.	N. Liu et al., 2018
Frango; [AFB1] = 400 ppb	Diminuição do número de células T CD4 ⁺ no jejuno.	Kraieski et al., 2017
Frango; [AFB1] = 0,06 mg/kg	Redução da % de subconjuntos de células T (T CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺) bem como os níveis de expressão de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF-α na mucosa do duodeno, jejuno e íleo, sugerindo que a função imunológica da mucosa intestinal pode ser afetada.	Jiang et al., 2015
Rato; [AFB1] = 2,5 mg/kg	Degeneração das vilosidades do duodeno e íleo.	Akinrinmade et al., 2016
Rato; [AFB1] = 100 µg/kg	Indução de apoptose do intestino delgado.	Jebali et al., 2018
Rato; [AFB1] = 0,2 mg/kg	A mucosa do intestino mostrou uma diminuição significativa no número de linfócitos T CD3 ⁺ e de atividade da fosfatase alcalina nos enterócitos, considerada um marcador de maturação ou diferenciação das mesmas. Verificaram-se alterações na imunidade sistêmica como linfopenia e neutropenia, monocitopenia. A diminuição das células T CD3 ⁺ sugere uma conexão com a diminuição da resistência do hospedeiro a doenças infecciosas.	Tomková et al., 2002

Desta forma, no geral, os efeitos adversos da exposição a esta micotoxina no intestino incluem uma resposta inflamatória ao longo da parede intestinal, o comprometimento da barreira intestinal (pela eventual destruição ou alteração da estrutura da camada de enterócitos) e do sistema imunológico, apoptose celular, inibição da síntese proteica e

ineficiência na absorção de nutrientes, reduzindo a funcionalidade do intestino. Por outro lado, atualmente ainda pouco se sabe sobre o **impacto desta aflatoxina no microbioma intestinal**. (Liew & Mohd-Redzwan, 2018; Shan, 2019; Voth-Gaeddert et al., 2019). No entanto, já alguns estudos demonstraram os seus efeitos tóxicos quando é administrada oralmente ou quando é introduzida na dieta de modelos animais (Tabela 7).

Tabela 7: Efeitos da AFB1 no microbioma intestinal

Modelo em estudo e [AFB1]	Efeitos da AFB1 no microbioma intestinal	Referência
Ratos ; [AFB1] = 25 µg/kg	Interrupção de várias vias metabólicas importantes da microbiota intestinal, incluindo a síntese de SCFAs, vias relacionadas ao ácido pirúvico, metabolismo de aminoácidos, ácidos biliares e ácidos gordos de cadeia longa, que podem afetar de forma significativa a eficiência digestiva do hospedeiro, o fornecimento de energia, a imunidade intestinal, produção de neurotransmissores e interferência entero-hepática.	Zhou et al., 2018
Ratos ; [AFB1] = 5, 25 e 75 µg/kg	Diminuição de espécies microbianas benéficas intestinais (como <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Lactococcus</i> spp.) de forma dependente da dose, e aumento de microrganismos intestinais prejudiciais. Indução de extensas alterações nos metabolitos relacionados à microbiota intestinal e redução na diversidade de nutrientes de uma forma dependente da dose → impacto adverso relativamente ao fornecimento nutricional do hospedeiro.	Zhou et al., 2019 J. Wang et al., 2016 Jin et al., 2021
Camarão branco pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) ; [AFB1] = 5 ppm	A abundância relativa dos filos <i>Proteobacteria</i> e <i>Firmicutes</i> no grupo experimental aumentou, enquanto a abundância relativa de <i>Bacteroidetes</i> diminuiu. A abundância relativa dos géneros <i>Vibrio</i> e <i>Photobacterium</i> aumentou, enquanto <i>Flavobacterium</i> e <i>Tenacibaculum</i> diminuiu. A AFB1 conduziu à proliferação de bactérias patogénicas e inibiu as bactérias benéficas.	Y. Wang et al., 2018

(Continua na página seguinte)

Tabela 7: Efeitos da AFB1 no microbioma intestinal (continuação)

Modelo em estudo e [AFB1]	Efeitos da AFB1 no microbioma intestinal	Referência
Ratos ; [AFB1] = 2,5; 4 e 10 mg/L	Ao nível do filo, ocorreu aumento de <i>Firmicutes</i> e <i>Actinobacteria</i> e diminuição de <i>Bacteroidetes</i> ; Ao nível do género, <i>Lactobacillus</i> aumentou significativamente nos grupos de dose baixa e alta, mas diminuiu no grupo de dose média; <i>Bacteroides</i> mostrou uma diminuição significativa no grupo de menor dose e uma ligeira diminuição no grupo de dose elevada. <i>Bifidobacterium</i> mostrou um aumento significativo com a dose mais elevada. <i>Escherichia</i> e <i>Lachnospiraceae</i> aumentaram significativamente no grupo de dose baixa e depois diminuíram nos grupos de dose média e alta. Verificou-se diminuição de espécies bacterianas intestinais benéficas e indução da proliferação de espécies potencialmente patogénicas, com o aumento da dose de AFB1.	X. Yang et al., 2017
Porco ; [AFB1] = 320 g/kg	Mudanças composicionais na microbiota intestinal, com o aumento do género <i>Bacteroides</i> e <i>Proteobacteria</i> e diminuição de <i>Firmicutes</i>	Grosu et al., 2019
Ratos; [AFB1] = 25 µg/kg	Os autores avaliaram 3 grupos de ratos (controlo, exposição à AFB1 e AFB1 + probiótico) e encontraram diferenças significativas entre os grupos de controlo e tratados com a AFB1, incluindo uma diminuição do género <i>Prevotella</i> neste último grupo.	Liew et al., 2019
Frangos; [AFB1] = 1; 1,5 e 2 ppm	Aumento significativo do número total de bactérias Gram-negativas em frangos alimentados com 2 e 1,5 ppm e uma tendência semelhante foi observada no número total de LAB. No entanto, os animais que receberam 1 ppm mostraram uma diminuição significativa do LAB total, mas um número total de bactérias aeróbias maior quando comparados aos frangos controlo.	Galarza-Seeber et al., 2016

Os dados destes estudos anteriores demonstraram que a exposição oral à AFB1 pode interromper uma série de vias metabólicas dependentes da microbiota intestinal, incluindo a utilização de energia, absorção de vitaminas e metabolismos essenciais de ácidos gordos,

aminoácidos e glúcidos em ratos. As alterações adversas das vias metabólicas podem contribuir para a patogénese hepática induzida pela AFB1, toxicidade imunológica e crescimento anormal (Zhou et al., 2019). No entanto, de momento, ainda não existe revisão bibliográfica suficiente que permita compreender os efeitos desta micotoxina no microbioma intestinal, na totalidade.

3. Metodologia Experimental

Neste estudo, o impacto da exposição materna à AFB1 na microbiota no início da vida, foi analisado através da exposição de 400 µg/kg dessa micotoxina a ratinhos fêmea durante a gravidez e lactação. As fezes dos descendentes foram colhidas imediatamente após o desmame e o DNA fecal foi extraído e purificado. O microbioma intestinal foi avaliado por uma **abordagem metagenómica filogenética**, como esquematizado na Figura 8. Esta abordagem, não dependente de cultura, baseia-se na amplificação de marcadores filogenéticos, mediante a utilização de PCR e sequenciação massiva de alto rendimento, *High-Throughput Next Generation Sequencing* (HT-NGS), que foi efetuada recorrendo aos sistemas MinION da Oxford Nanopore e Miseq Illumina, disponíveis no Laboratório Hércules da Universidade de Évora. Após a extração do DNA e a sua quantificação por métodos fluorométricos, efetuou-se uma amplificação das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA. Essas amplificações foram posteriormente purificadas com esferas magnéticas e indexados em reação de PCR de ciclo limitado com indexes duplos (i7 e i5) (Nextera XT Index Kit, Illumina, San Diego, CA). Foram realizadas eletroforeses em gel de agarose, de forma a confirmar a integridade do DNA e preparadas e validadas bibliotecas de fragmentos com os *amplicons* quantificados, normalizados e agrupados. As bibliotecas desnaturadas foram sequenciadas e, após essa sequenciação, os fragmentos foram desmultiplexados, filtrados por qualidade e as unidades taxonómicas operacionais (OTUs) foram determinadas por agrupamento de leituras em bases de dados de referência 16S (ex: Greengenes e ARB Silva). Desta forma, o impacto da exposição às micotoxinas foi analisado relativamente à quantificação e abundância relativa de diferentes taxa bacterianos do microbioma intestinal. Pela primeira vez, a quantificação e abundância relativa de diferentes taxa bacterianos permitirá relacionar o microbioma intestinal no início da vida, sistema imunológico e a exposição a micotoxinas.

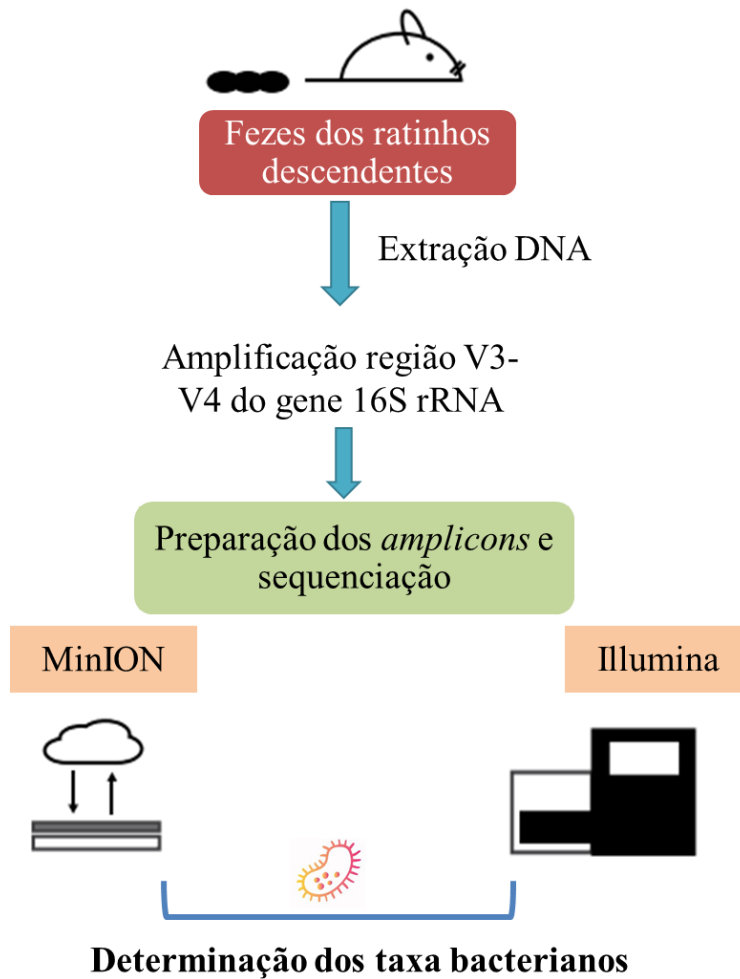


Figura 8: Esquematização da metodologia utilizada no trabalho experimental

3.1. Sequenciação de Nova Geração

No microbioma a diversidade é determinada, em particular, por elevadas taxas de mutação, que podem gerar tanto substituições de nucleótidos quanto inserções ou deleções, assim como eventos de recombinação genética. A patogênese, a progressão e a epidemiologia de várias doenças são afetadas pela diversidade genética criada nas populações microbianas e, por isso, caracterizar essa diversidade é de extrema importância em ambientes clínicos e de investigação (Harel et al., 2019).

Ao longo da última década, têm sido feitos grandes avanços na compreensão da estrutura, função e ecologia dos microrganismos em sistemas naturais, numa variedade de

habitats, interações com o hospedeiro e interações entre os próprios microrganismos. Esses avanços foram alcançados, em grande parte, pelo desenvolvimento de ferramentas moleculares, principalmente NGS, que permitem a determinação de taxons microbianos sem a necessidade de cultura, substituindo a caracterização convencional de microrganismos patogênicos pela morfologia, propriedades de coloração e critérios metabólicos por uma caracterização genética, utilizando ferramentas de bioinformática para processar bilhões de sequências de DNA geradas a partir dessas tecnologias (Sadowsky et al., 2017). Por outras palavras, o NGS permite a sequenciação massiva de milhões de reações realizadas em paralelo, com elevado rendimento; assim, a estrutura completa do DNA é conhecida - com uma precisão que não pode ser alcançada por outros métodos (Lindberg et al., 2016). Esta tecnologia inovadora permite uma vasta gama de aplicações aos investigadores, nomeadamente: **(i)** sequenciar rapidamente genomas inteiros; **(ii)** amplificar para sequenciar profundamente as regiões alvo; **(iii)** utilizar sequenciação de RNA para descobrir novas variantes ou quantificar mRNAs para análise de expressão génica; **(iv)** analisar fatores epigenéticos, como metilação de DNA em todo o genoma e interações DNA-proteína; **(v)** sequenciar amostras cancerígenas para estudar variantes somáticas raras; **(vi)** estudar o microbioma humano e descobrir novos microrganismos patogênicos (Illumina Inc., 2021).

Assim, as principais **vantagens do NGS** incluem a independência de cultura, ou seja, a construção da biblioteca a sequenciar e a amplificação clonal do DNA são realizadas *in vitro*; a possibilidade de sequenciação de várias amostras simultaneamente (multiplexação), que permite reduzir tempo e custos; a sequenciação baseada em *array*, permitindo a imobilização de DNA em fase sólida. No entanto, uma **limitação** reconhecida desta tecnologia é a necessidade, na maioria das vezes, de uma etapa de amplificação por PCR, à qual estão associados alguns problemas como contaminações de reagentes, formação de dímeros e tendências na amplificação (Fanning et al., 2017); é também uma técnica que requer sistemas de bioinformática sofisticados, processamento rápido de dados e grandes recursos de armazenamento de dados. Para além disso, a análise de milhões de sequências que permite chegar a conclusões estatística e cientificamente significativas ainda é demorada, havendo igualmente algumas áreas do genoma que são difíceis de sequenciar ou analisar e limitações no conhecimento de como interpretar mutações novas ou raras (Kchouk et al., 2017).

A metagenômica e as análises de sequenciação do gene 16S rRNA têm vindo a melhorar, e o número de sequenciadores aumentou nos últimos anos. Geralmente, **as tecnologias NGS dividem-se em dois tipos** (Fig. 9). Aquelas que são de segunda geração (como a Illumina), caracterizadas pela necessidade de amplificação antes de iniciar a sequenciação do DNA; e as tecnologias de terceira geração (como o MinION™) que surgiram recentemente e que, ao contrário da segunda geração, podem fazer a sequenciação de uma única molécula sem a necessidade de criar as bibliotecas de amplificação e que são capazes de gerar leituras mais longas, a custos muito mais baixos, e em menos tempo (Kchouk et al., 2017; Santos et al., 2020).

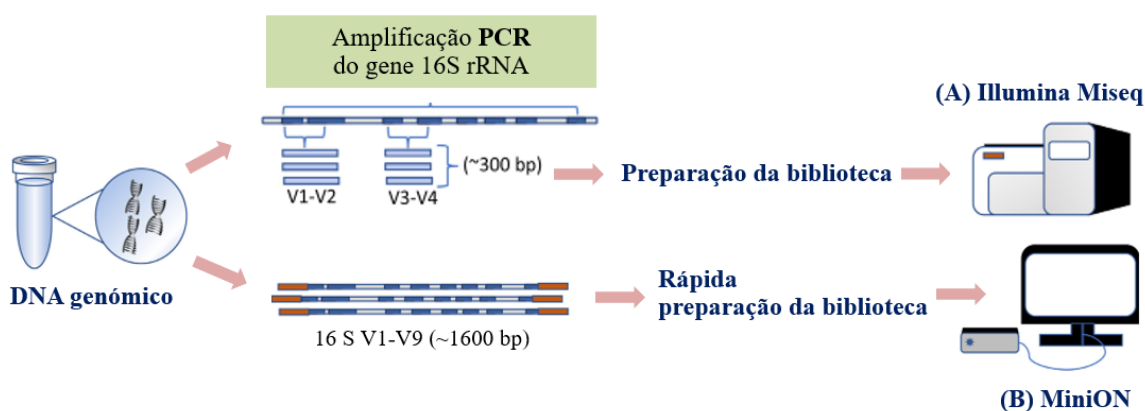


Figura 9: Tipos de tecnologia NGS (A) segunda geração (B) terceira geração (adaptado de Santos et al., 2020)

3.1.1. Illumina Miseq

A tecnologia de NGS da Illumina é baseada na sequenciação por síntese, que possibilita uma sequenciação rápida, precisa e de elevado rendimento. O fluxo de trabalho inclui **quatro etapas básicas** representadas na Figura 10: (a) preparação da biblioteca e controlo de qualidade; (b) amplificação (PCR em ponte) – geração de clusters; (c) sequenciação por síntese; (d) análise dos dados por bioinformática (Illumina Inc., 2017).

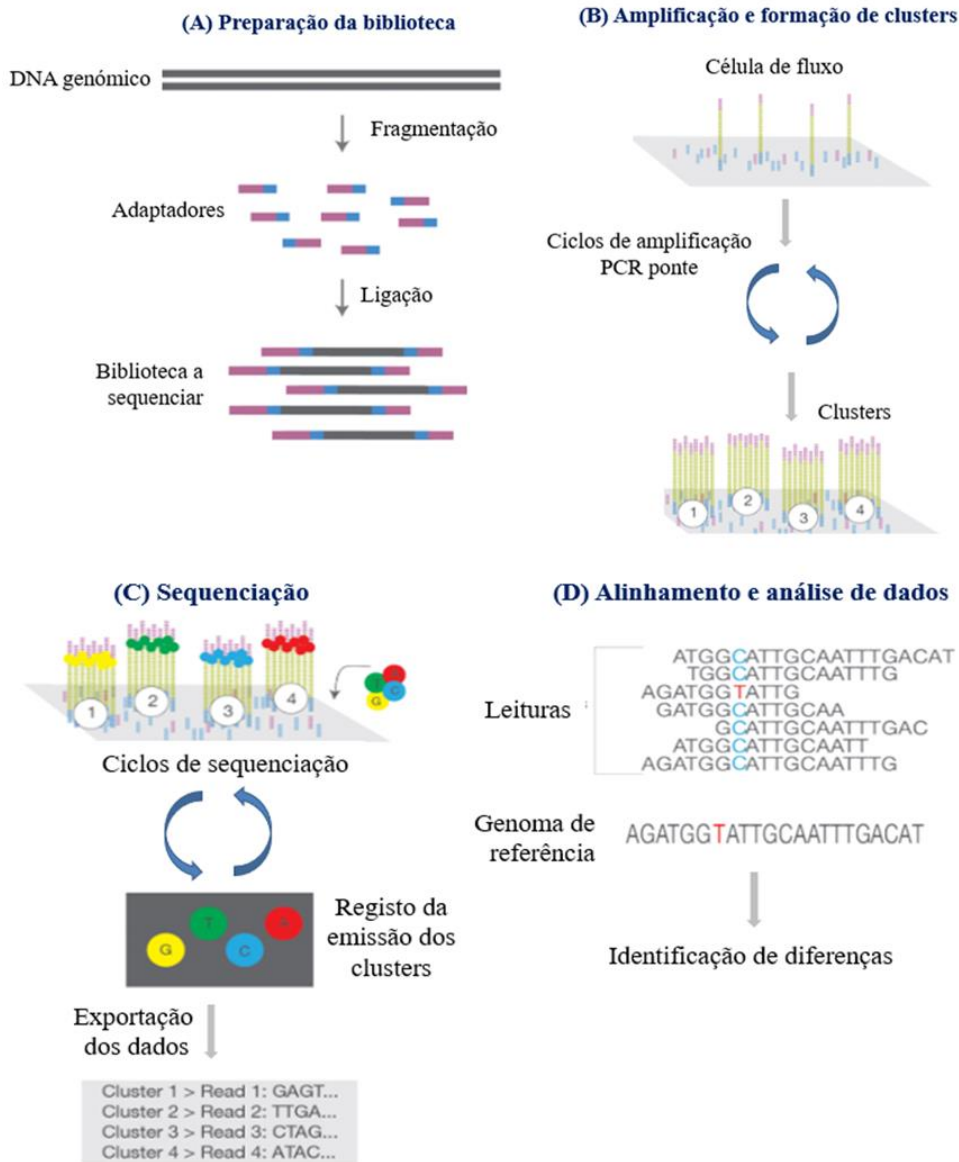


Figura 10: Fluxo de trabalho Illumina (adaptado de Illumina, 2016)

As **bibliotecas de sequenciação** são uma coleção de fragmentos de DNA normalmente construídas fragmentando o DNA e adicionando adaptadores específicos em ambas as extremidades. Esses adaptadores são sequências únicas, conhecidas e complementares, que permitem que os fragmentos se liguem à célula de fluxo. Os fragmentos podem então ser amplificados e purificados (Illumina Inc., 2021).

A preparação da biblioteca é necessária antes de se executar a sequenciação e tem **2 objetivos essenciais**: **(i)** gerar fragmentos de tamanho adequado, por fragmentação enzimática, quebra mecânica ou PCR; **(ii)** adicionar adaptadores às extremidades de cada fragmento, cujas principais funções são: permitir a hibridização com os *chips* de sequenciação na superfície da célula de fluxo; fornecer uma localização de iniciação para ambos os *primers* de amplificação e sequenciação; e fornecer códigos de barras para multiplexar diferentes amostras na mesma execução (K. Feng et al., 2018).

Depois da construção da biblioteca deve ocorrer uma fase de **controle de qualidade**, isto é, a biblioteca deve ser validada quantitativa e qualitativamente, de maneira a verificar se há uma quantidade suficiente de DNA de boa qualidade na biblioteca preparada. Em termos de qualidade, uma boa biblioteca é aquela que possui um conjunto diversificado de fragmentos de DNA com o mínimo de fragmentos duplicados. Relativamente à quantificação, é realizada através da técnica de PCR em tempo real ou por um método fluorométrico (Vincent et al., 2017).

De seguida, realiza-se a **amplificação por PCR em ponte** - uma reação de amplificação que ocorre na superfície de uma célula de fluxo Illumina, ou seja, é o processo em que cada fragmento da biblioteca é clonado em milhares de cópias idênticas. O DNA fragmentado é ligado a sequências adaptadoras e ligado a um *primer* imobilizado num suporte sólido – a célula de fluxo padronizada - que é densamente revestido com *primers* complementares àqueles que foram anexados aos fragmentos da biblioteca. O DNA é então anexado à superfície da célula aleatoriamente, onde é exposto a reagentes para ocorrer a sua extensão, pela enzima polimerase. Quando se adicionam nucleótidos e enzimas, as extremidades livres das cadeias simples de DNA ligam-se à superfície da célula através de *primers* complementares, criando estruturas em ponte. As enzimas, então, interagem com as pontes para torná-las de cadeia dupla, de modo que, quando a desnaturação ocorre, dois fragmentos de DNA de cadeia simples são fixados à superfície nas proximidades. A repetição desse processo leva à formação de grupos clonais de cadeias idênticas, designados *clusters* (Goodwin et al., 2016).

Sequenciar é determinar a ordem na qual os nucleótidos estão numa dada molécula de DNA. As plataformas NGS Illumina incluem **sequenciação por síntese** que utiliza a

incorporação passo a passo de nucleótidos reversivelmente fluorescentes e bloqueados. Esses são modificados de duas maneiras: **i)** cada nucleótido é reversivelmente ligado a uma única molécula fluorescente com comprimentos de onda de emissão únicos, e **ii)** cada nucleótido também é bloqueado reversivelmente garantindo que apenas um único nucleótido será incorporado por ciclo. Todos os quatro nucleótidos (A, T, C, G) são adicionados ao *chip* de sequenciação e, após a incorporação do nucleótido, as bases de DNA restantes são lavadas. O sinal fluorescente é lido e indica qual o nucleótido que foi adicionado em cada *cluster*, sendo depois registado; a molécula fluorescente e o grupo terminador são então fragmentados e removidos. Este processo é repetido até que a reação de sequenciação seja concluída (Schirmer et al., 2015; Illumina Inc., 2021; Applied Biological Materials Inc., 2021).

O processo de **análise de dados** desta tecnologia inclui **três etapas principais**: análise de dados primária, secundária e terciária. Algumas etapas são realizadas automaticamente no equipamento, enquanto outras ocorrem após a conclusão da sequenciação.

Na análise de dados primária, ocorrem ciclos de química e imagem de sequenciação, fornecendo chamadas de base e pontuações de qualidade associadas, que representam a estrutura primária das cadeias de DNA. Na análise secundária, o alinhamento e construção dos fragmentos de DNA fornecem a sequência completa para uma amostra, a partir da qual as variantes genéticas podem ser determinadas. Por último, numa análise terciária, a partir dos dados da sequência, pode utilizar-se a exploração de dados biológicos e ferramentas de interpretação para converter dados em conhecimento (Illumina Inc., 2017).

O Illumina MiSeq tem várias **vantagens** que melhoram a quantidade e qualidade dos dados de sequenciação que são gerados, em particular **(i)** a capacidade de produzir 1300 MB numa única execução, com comprimentos de leitura de até 300 pb, em 3 dias; **(ii)** os reagentes químicos melhorados; **(iii)** a capacidade de proceder à indexação e multiplexar amostras, para posterior armazenamento, recorrendo à bioinformática; **(iv)** a possibilidade de realizar análises independentes. Todavia, essa tecnologia tem também algumas **limitações**, principalmente **(i)** a geração de leituras com comprimentos curtos, que normalmente variam entre 75 e 600 pb e um tempo de processamento elevado, devido, em parte, ao grande número de leituras produzidas por execução (Sadowsky et al., 2017); **(ii)** a eventual ocorrência de ruídos no sinal do *cluster*, fazendo com que a síntese de algumas moléculas fique para trás;

como o número de sequências afetadas aumenta a cada ciclo, limita o comprimento total da leitura (Schirmer et al., 2015).

3.1.2. MinION Oxford Nanopore

O *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) **MinION™** é uma nova tecnologia de sequenciação de "terceira geração" (isto é, sequenciação de uma única molécula), lançado em 2014, que usa um nanoporo como biossensor para sequenciar uma molécula de DNA de cadeia simples longa (Magi et al., 2017). Atualmente, tem atraído interesse na comunidade genômica, sendo frequentemente utilizado para sequenciar *amplicons*, genomas inteiros de bactérias e vírus e, mais recentemente, genomas mitocondriais de ratinhos e leveduras (Heikema et al., 2020). Este sistema tem sido recomendado por (i) possibilitar comprimentos de leitura de dezenas de kilobases que podem abranger a maior parte do gene 16S rRNA bacteriano; (ii) gerar dados em tempo real, ser de baixo custo e permitir a geração de leituras longas; (iii) a preparação das amostras ser relativamente simples; (iv) ser o sequenciador de DNA mais fácil de transportar devido ao pequeno tamanho do instrumento (Laver et al., 2015; Lindberg et al., 2016; Fanning et al., 2017). O MiniON™ conecta-se diretamente a um computador através de uma porta USB, sem a necessidade de infraestruturas de computação adicionais (Elliott et al., 2020).

As atuais células de fluxo MinION™ – ou seja, os locais onde as bibliotecas de DNA são inseridas - contêm 2,048 nanoporos de proteínas individuais organizadas em 512 canais, cada um contendo quatro poros. Cada canal mede o sinal gerado por um dos quatro poros de uma vez, permitindo processar até 512 moléculas de DNA simultaneamente. Para sequenciar o DNA de cadeia dupla (dsDNA) (Fig.11), este é preparado adicionando às suas extremidades dois adaptadores com proteínas motoras. O adaptador principal vai guiar os fragmentos de dsDNA para a vizinhança dos poros e o processo de sequenciação começa quando a proteína motora descompacta o dsDNA, permitindo que a primeira cadeia (modelo) passe através do nanoporo, uma base de cada vez. No final da cadeia modelo, a proteína motora medeia o movimento da cadeia complemento através do poro, de maneira semelhante. Quando a cadeia de DNA passa pelo nanoporo, um sensor mede as mudanças de corrente iônica entre o molde

e a cadeia complemento; esse processo gera um sinal que é reconhecido pelo poro. Os dados são então submetidos à chamada de base para obter uma sequência consenso, para as cadeias modelo e complemento separadamente. Ou seja, por outras palavras, este tipo de sequenciação envolve a passagem de uma molécula de DNA de cadeia simples (ssDNA) através de um poro nanoscópico e a medição do seu efeito numa corrente elétrica. Os sinais de corrente são então usados para inferir a sequência do ssDNA através de algoritmos de instrução no equipamento. Os dados que se adquirem através desta técnica permitem estudar a estrutura de grandes genomas, como o genoma humano, para desvendar a arquitetura de regiões altamente repetitivas, a deteção de variantes estruturais complexas e a reconstrução de haplótipos, embora representem novos desafios computacionais (Magi et al., 2017; Fanning et al., 2017).

As **vantagens** desta metodologia incluem, por exemplo, o facto da sequenciação de uma única molécula anular a necessidade de amplificação por PCR (Laver et al., 2015). A sequenciação com nanoporos pode gerar sequências de elevada qualidade sem limites teóricos de comprimento, exceto aqueles introduzidos durante a preparação da amostra (Magi et al., 2017; Kai et al., 2019). Geram-se leituras longas, permitindo cobrir a sequência completa do gene 16S rRNA (regiões V1-V9) através de um processo rápido (1-48h), barato e de elevado rendimento. Uma das vantagens mais relevantes é o facto desta tecnologia oferecer um nível mais elevado de resolução taxonómica e filogenética para identificação bacteriana, uma vez que todos os *locus* informativos do gene 16S rRNA são considerados na análise (Santos et al., 2020). Como qualquer método, também este possui algumas **limitações** que incluem **(i)** taxas de erro relativamente elevadas, com a proporção de erros numa leitura a exceder frequentemente os 10%; **(ii)** necessidade de preparação de uma biblioteca antes da sequenciação; **(iii)** presença frequente de inserções e deleções geradas artificialmente nas sequências, que podem introduzir alguns obstáculos para analisar e interpretar corretamente os dados do MinION™ (Laver et al., 2015; Lindberg et al., 2016; Harel et al., 2019; Santos et al., 2020).

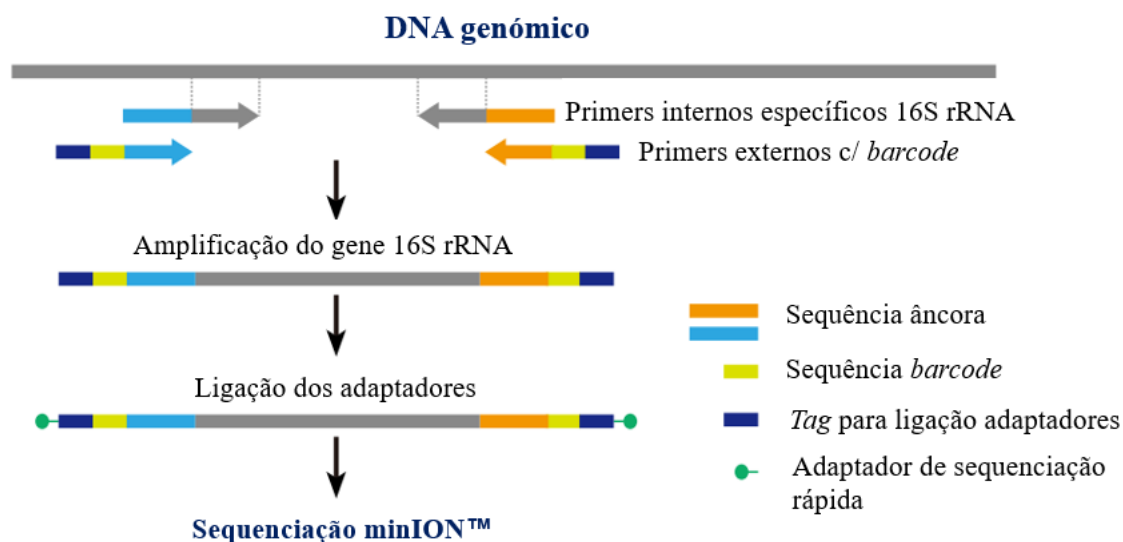


Figura 11: Análise da seqüência do gene 16S rRNA usando o MinION™ (adaptado de Matsuo, 2021)

3.2. Processamento das amostras intestinais

Para a otimização da autoalimentação da aflatoxina B1, foram realizadas experiências piloto para otimizar o número de fêmeas a cruzar e o protocolo de alimentação das micotoxinas durante a gravidez, mantendo o distúrbio feminino o mais baixo possível. Para além disso, nem todas as fêmeas cruzadas com o macho obteriam a secreção vaginal e, dessas, nem todas as fêmeas ficariam grávidas (a taxa de sucesso varia de acordo com a estirpe, a experiência da fêmea, as condições, etc.), por isso foi investigado como é que o protocolo de alimentação das micotoxinas durante a gravidez e lactação influenciaria o número efetivo de fêmeas e ninhadas.

Neste sentido, e com base na exaustiva pesquisa bibliográfica, foram escolhidas as doses e horários mais adequados da administração da aflatoxina, com o objetivo de reduzir os efeitos adversos na fertilidade do sistema reprodutivo, parto prematuro e perda fetal, bem como evitar os efeitos teratogénicos e carcinogénicos deste contaminante alimentar. As fêmeas C57BL6/J de 6 a 8 semanas de idade foram previamente injetadas intraperitonealmente com gonadotrofina sérica de égua grávida (PMSG) e gonadotrofina coriónica humana (hCG) para sincronizar a ovulação, e depois foram cruzadas com os

machos. As fêmeas com secreção vaginal foram alimentadas com *pellets* de gelatina contendo 400 µg/kg de AFB1 diluída em DMSO (animais tratados, n = 3) ou com o veículo DMSO (grupo de controlo, n = 3), durante a gravidez (a partir do 11º dia de gestação) e durante os períodos de lactação. As fezes dos descendentes de ambas as fêmeas, tratadas e controlo, foram colhidas imediatamente após o desmame e o DNA fecal foi extraído e purificado.

3.3. Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras de fezes das ninhadas foi utilizado o Kit E.Z.N.A.® Stool DNA Kit, Omega BIO-TEK. Foi adicionado até 200 mg de amostra de fezes num tubo de microcentrífuga de 2 mL contendo 200 mg de esferas de vidro X e este foi colocado no gelo. De seguida, adicionaram-se 540 µL de tampão SLX-Mlus e foi utilizado o vórtex até a amostra de fezes estar completamente homogeneizada; adicionou-se 60 µL de tampão DS e 20 µL de solução de Proteinase K e voltou a utilizar-se o vórtex para misturar bem. Incubou-se a 70 °C por 13 minutos, colocando a amostra duas vezes no vórtex durante este processo. Adicionaram-se 200 µL de tampão SP2 e utilizou-se o vórtex em velocidade máxima durante 30 segundos e, posteriormente, deixou-se a descansar no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se na velocidade máxima ($\geq 13,000g$) por 5 minutos e aspirou-se cuidadosamente 400 µL do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de reagente cHTR e a amostra foi colocada no vortex na velocidade máxima por 10 segundos para, posteriormente, deixar descansar à temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugou-se na velocidade máxima por 2 minutos e transferiu-se 250 µL do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 250 µL de tampão BL e 250 µL de etanol 100% e agitou-se novamente no vórtex na velocidade máxima por 10 segundos. Inseriu-se uma Mini coluna HiBind® DNA num tubo de colheita de 2 mL e transferiu-se para lá toda a amostra anterior. Centrifugou-se na velocidade máxima por 1 minuto e foi descartado o filtrado e o tubo de colheita. Transferiu-se a Mini coluna HiBind® DNA para um novo tubo de colheita de 2 mL e adicionou-se 500 µL de tampão VHB. De seguida, centrifugou-se na velocidade máxima por 30 segundos e descartou-se novamente o filtrado, reutilizando-se desta vez o tubo de colheita. Adicionaram-se 700 µL de tampão de lavagem do DNA e centrifugou-se na velocidade máxima por 1 minuto, descartando depois

o filtrando e reutilizando o tubo de colheita. Repetiu-se a etapa de adição dos 700 μL do tampão de lavagem para uma segunda etapa de lavagem. Centrifugou-se a Mini coluna HiBind® DNA vazia na velocidade máxima por 2 minutos à temperatura ambiente e transferiu-se a coluna para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionaram-se 100-200 μL de tampão de eluição aquecido a 65 °C diretamente no centro da matriz HiBind® e deixou-se repousar à temperatura ambiente por 2 minutos. Por fim, centrifugou-se à velocidade máxima por 1 minuto e o DNA foi armazenado a - 20 °C.

3.4. Purificação do DNA com esferas magnéticas

Para purificar o DNA, foi utilizado o reagente HighPrep™ PCR Clean-up System; este é um reagente de limpeza pós-PCR baseado em grânulos paramagnéticos projetado para uma purificação eficiente dos fragmentos de DNA e seleção restrita de *amplicons* de tamanho específico. A purificação consiste na remoção de sais, *primers*, *primer*-dímeros e dNTPs, uma vez que os fragmentos de DNA são seletivamente ligados às partículas magnéticas. O DNA altamente purificado é eluído, com um tampão de eluição, e pode ser usado diretamente para outras aplicações, nomeadamente NGS (Genomics, 2021).

Foram adicionados a cada tubo de 1,5 mL, 24 μL de HighPrep™ PCR com 25 μL da amostra de DNA e foi misturado 6-8 vezes com a pipeta. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram colocados no suporte magnético durante 3 minutos até a solução ficar clara. O sobrenadante foi removido e descartado com a pipeta. Ainda com os tubos no suporte, para um processo de lavagem, foram adicionados 200 μL de etanol a 70% a cada tubo, e estes foram incubados durante 30 segundos. Este processo foi realizado duas vezes. Para lavar as esferas, os tubos foram abertos durante 10 a 15 minutos à temperatura ambiente, para garantir que todo o álcool foi evaporado. Os tubos foram retirados do suporte magnético e foi-lhes adicionado 10 μL de tampão Tris pH 8.0, agitando com a pipeta. Estes foram incubados 5 minutos e foram novamente colocados no suporte durante cerca de 3 minutos, até a solução ficar clara. Por fim, o sobrenadante resultante (DNA purificado) foi transferido para tubos de 0,2 mL para armazenar.

3.5. Eletroforese em gel de agarose

Para verificar a integridade do DNA, foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 2%. Para a preparação dos géis de agarose, pesaram-se 0,9 g de agarose e mediram-se 45 mL de tampão Tris-borato-EDTA (TBE), juntando-se os dois num frasco de vidro, agitando-se. Colocou-se a aquecer no micro-ondas de 30 em 30 segundos, até ficar uma solução transparente, e adicionaram-se 5 µL de corante GreenSafe, um reagente não mutagénico e muito sensível, utilizado na deteção de ácidos nucleicos, que proporciona a visualização instantânea das bandas expostas à luz ultravioleta. O gel foi colocado na superfície da placa e, por cima, foi colocado o pente. Após o arrefecimento do gel, o pente foi retirado, e o gel foi transferido para uma tina ligada a uma fonte de alimentação (Cuba de eletroforese para DNA Mini-Sub®, Sub-Cell, ReadyAgarose™, BIO-RAD) onde foram aplicadas as amostras nos respetivos poços. Em cada poço das amostras foi pipetado 2 µL de 6 × NZYDNA Loading Dye e 5 µL da amostra. Para o poço do padrão foram pipetados 5 µL de NZYDNA Ladder VII e 2 µL 6 × NZYDNA Loading Dye. Desta forma, produz-se um padrão de 14 bandas regularmente espaçadas, variando de 100 a 3000 pb. A voltagem foi programada para 95 V, iniciando-se a corrida eletroforética.

No final do processo, o gel foi retirado da tina e colocado no equipamento que permite a sua visualização (ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software). Esse sistema de elevada sensibilidade e deteção é controlado pelo software Image Lab para otimizar o desempenho e análise de imagem rápida, integrada e automatizada de várias amostras (Bio-Rad Laboratories, 2021).

3.6. Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA foi utilizado o kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Foi preparado um branco, adicionando 199 µL QuantiFluor® ONE dsDNA Dye e 1 µL de tampão 20X TE (pH 7,5); e um padrão adicionando 199 µL QuantiFluor® ONE dsDNA Dye e 1 µL Standard (Lambda DNA). Para preparar as amostras a quantificar, foi colocado 199 µL QuantiFluor® ONE dsDNA Dye e 1 µL de cada amostra, nos respetivos tubos. Cada tubo foi agitado no vórtex por 10 segundos e colocado a incubar durante 5

minutos à temperatura ambiente, no escuro. Para quantificar o DNA das amostras por fluorimetria, utilizou-se o equipamento Quantus™ Fluorometer.

3.7. Sequenciação massiva de elevado rendimento

As comunidades bacterianas foram caracterizadas por sequenciação massiva de elevado rendimento, utilizando o sistema **Illumina Miseq**, para a região 16S rRNA V3-V4. O DNA foi amplificado para as regiões hipervariáveis com *primers* específicos (*primer* direto Bakt_341F 50 CCTACGGGNGGCWGCAG-30 e *primer* reverso Bakt_805R 50-GACTACHVGGGTATCTAATCC-30) e, posteriormente, re-amplificado numa reação de PCR de ciclo limitado, para adicionar indexes duplos e adaptadores de sequenciação a ambas as extremidades da região alvo amplificada (Dias et al., 2020; Rosado et al., 2020; Caldeira et al., 2021).

3.7.1. Amplificação por PCR

Foram adicionados 5 µL do *Primer* Forward (1 mM) e 5 µL do *Primer* Reverse (1 mM), 10 µL de ReadyMix™ Taq PCR e, por fim, 5 µL de cada amostra para os respectivos tubos PCR, perfazendo um volume total de 25 µL em cada tubo.

Os tubos foram colocados no termociclador programado para 35 ciclos com as seguintes condições:

Tabela 8: Condições de amplificação PCR

Passos do ciclo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Desnaturação inicial	95	60
Desnaturação	95	15
Polimerização	55	15
Extensão	72	10
Extensão final	72	120
Hold	4	∞

3.7.2. Indexação

Para um volume total de 50 µL, adicionaram-se 10 µL de água RNase Free, 25 µL de ReadyMix™ Taq PCR, 5 µL de cada index (i7 e i5) (Nextera XT Index Kit, Illumina, San

Diego, CA, EUA) e 5 μL do DNA de cada amostra. As condições da indexação por PCR envolveram 3 min de desnaturação a 95 °C, seguido por 8 ciclos de 95 °C por 20 s, 55 °C por 30s, 72 °C por 30s e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

De seguida, os fragmentos amplificados foram purificados usando esferas magnéticas HighPrep™ PCR Clean-up System, conforme descrito na secção 3.4 da metodologia, alterando somente o volume de esferas magnéticas para 60 μL e o volume do tampão de eluição para 27 μL . Os *amplicons* foram quantificados por fluorimetria com o kit de quantificação dsDNA QuantiFluor® dsDNA System (Promega), conforme descrito na secção 3.6 da metodologia.

3.7.3. Preparação da biblioteca de fragmentos e sequenciação

Antecipadamente foi ligado o termobloco a 96 °C e foi preparado o NaOH 0,2 M, colocando 2 μL de NaOH 2M com 18 μL de água RNase Free, mantendo no gelo. Para a preparação da biblioteca, foi preparado um Pool a 4 nM, misturando num tubo 5 μL de cada produto Index PCR purificado. Foi igualmente preparado o Phix a 4 nM, juntando 2 μL de Phix 10 nM com 3 μL Tris 10 mM (pH 8,5).

Para a desnaturação do Pool (dPool 4nM) foram adicionados 5 μL do Pool 4 nM anteriormente preparado e 5 μL de NaOH 0,2 M a um tubo e este foi agitado no vórtex sendo, de seguida, incubado 5 minutos à temperatura ambiente. Para obter o Phix desnaturado (dPhix), foram colocados num tubo 5 μL de Phix (4 nM) e 5 μL de NaOH 0,2 M, este foi agitado no vórtex e incubado 5 minutos à temperatura ambiente. Depois foram realizadas as diluições (no gelo) do dPool e do dPhix da seguinte maneira: para se obter uma concentração de 20 pM, foram adicionados 10 μL de dPool 4 nM e 10 μL de dPhix 4 nM em tubos respetivos, adicionando 990 μL de tampão HT1 em cada um deles; para se obter uma concentração de 10 pM, foram adicionados 300 μL do dPool 20 pM + 300 μL de HT1 e 50 μL do dPhix 20 pM + 50 μL de HT1, nos dois tubos correspondentes. Adicionaram-se (no gelo) 510 μL do dPool 10 pM e 90 μL do dPhix 10 pM num tubo, para se obter a biblioteca combinada. Incubou-se durante 2 minutos a 96 °C no termobloco, inverteu-se o microtubo duas vezes e manteve-se 5 minutos no gelo antes de se colocar a biblioteca na Cartridge. Enquanto isso, foi carregado o ficheiro da corrida no MiSeq®, a *Flow Cell* foi lavada, secada

e colocada no equipamento, juntamente com o tampão e o tubo de despejos. Para aplicar a amostra na Cartridge, inverteu-se 10 vezes e bateu-se para tirar as bolhas; abriu-se o orifício com a ponta da pipeta P1000 e aplicou-se a amostra no orifício adequado. Bateu-se na Cartridge e colocou-se no Illumina Miseq para iniciar a corrida durante cerca de 24h (Dias et al., 2020; Rosado et al., 2020; Caldeira et al., 2021).

3.7.4. Análise de dados

A corrida foi realizada usando o MiSeq Reagent nano Kit V2 no Illumina MiSeq System, onde a sequenciação foi realizada utilizando uma configuração 2×250 emparelhada; a análise de imagem e a chamada de base foram conduzidas pelo MiSeq Control Software (MCS) diretamente no instrumento MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA).

Os *amplicons* foram multiplexados automaticamente pelo sequenciador Miseq® usando o pacote CASAVA (Illumina, San Diego, CA, EUA) e filtrados por qualidade com o software PRINSEQ usando os seguintes parâmetros: (1) bases com qualidade média inferior a Q25 numa janela de 5 bases e (2) leituras com menos de 220 bases foram descartadas. As leituras direta e inversa foram então combinadas por sobreposição de leituras emparelhadas usando o software AdapterRemoval v2.1.5 com parâmetros padrão. O pacote QIIME v1.8.0 foi usado para a geração das OTUs, identificação taxonómica e cálculo dos índices de riqueza e diversidade das amostras. Os IDs da amostra foram atribuídos às leituras combinadas e convertidos para o formato rápido (`split_libraries_fastq.py`, QIIME). As leituras combinadas quiméricas foram detectadas e removidas usando o UCHIME contra o banco de dados Greengenes v13.8. As OTUs foram selecionadas num limite de similaridade de 97% usando a estratégia de referência aberta. Primeiro, as leituras combinadas foram pré-filtradas removendo sequências com similaridade inferior a 60% em relação ao banco de dados Greengenes v13.8; as leituras combinadas restantes foram então agrupadas com 97% de similaridade com os mesmos bancos de dados mencionados anteriormente. As leituras combinadas que não foram agrupadas na etapa anterior, foram agrupadas novamente em OTUs com 97% de similaridade e aquelas com menos de duas leituras foram removidas da tabela. Uma sequência representativa de cada OTU foi então selecionada para atribuição da taxonomia (`pick_rep_set.py`, `assign_taxonomy.py`; QIIME) (Dias et al., 2020; Rosado et al., 2020; Caldeira et al., 2021).

3.8. Sequenciação massiva de elevado rendimento independente de PCR

3.8.1. Reação de amplificação e indexação

Em cada tubo PCR, foi colocado 14 μL de água RNase Free, 10 μL do DNA da amostra, 1 μL do *bar code* correspondente e 25 μL de Taq polimerase perfazendo um volume total de 50 μL . A reação de indexação efetuou-se num termociclador MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler BIO-RAD® com as seguintes condições:

Tabela 9: Condições de amplificação PCR MinION

Passos do ciclo	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	60	1
Desnaturação	95	20	25
Polimerização	55	30	25
Extensão	65	120	25
Extensão final	65	300	1
Hold	4	∞	

3.8.2. Preparação da biblioteca e sequenciação

Para a preparação da biblioteca de fragmentos a ser sequenciada, misturaram-se 2 μL de DNA, 1 μL de *Rapid Adapter* (RAP) e 34 μL de *Sequencing buffer* (SQB) num só tubo de 1,5 mL com a pipeta e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Foi preparado um tampão de sequenciação, juntando 500 μL de *Flush Buffer* (FB) com 15 μL de *Flush Tether* (FTL) igualmente num tubo de 1,5 mL, misturando bem com a pipeta.

Com a célula de fluxo ligada ao equipamento MiniONTM, e após retirar as bolhas de ar, foram colocados 500 μL do tampão preparado anteriormente e 45 μL da amostra. O equipamento foi colocado a fazer as leituras durante cerca de 24 horas.

3.8.3. Análise de dados

A partir do momento em que a aquisição de dados começa, a análise é realizada em tempo real com a plataforma EPI2ME. Esta oferece a visualização de gráficos intuitivos -

mostrando o número de leituras e a distribuição do comprimento da leitura - que facilitam a interpretação das amostras individuais ou múltiplas, com os códigos de barras. O *output* da plataforma inclui o número de leituras analisadas e a sua classificação taxonómica, permitindo assim a rápida identificação e quantificação dos filós, géneros e espécies bacterianas (Technologies, 2021).

4. Resultados e discussão

Devido à elevada probabilidade de exposição às micotoxinas durante a gravidez, é possível que as crianças apresentem vias de exposição únicas no que diz respeito aos produtos químicos nos alimentos, *in-utero* através da placenta e após o nascimento, através da amamentação. Neste sentido, a aflatoxina B1, que constitui uma das principais toxinas fúngicas e um dos mais potentes carcinogénicos naturais conhecidos, merece especial atenção, uma vez que os seus efeitos a longo prazo, derivados de uma exposição precoce, ainda não foram totalmente avaliados (Groopman et al., 2014; Smith et al., 2017).

Assim, este trabalho pretende ser um contributo para compreender o impacto da exposição materna à AFB1, na microbiota, em ratinhos no início da vida. A exposição de ratinhos fêmea à micotoxina durante a gravidez e lactação, seguida da avaliação do microbioma intestinal dos seus descendentes por uma **abordagem metagenómica filogenética** (Figura 12), permitiu detetar os diferentes taxa bacterianos que determinam diferenças no padrão do microbioma infantil.

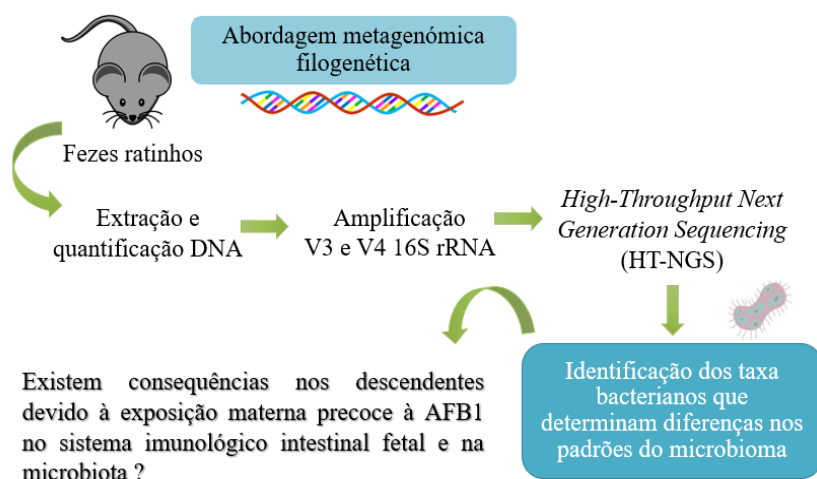


Figura 12: Exposição materna à AFB1 nos ratinhos fêmea no início de vida

4.1. Autoalimentação da micotoxina nas fêmeas grávidas

Para a otimização da autoalimentação da micotoxina nas fêmeas grávidas, esquematizado na Figura 13, em primeiro lugar foram realizadas experiências piloto para otimizar o número de fêmeas a cruzar e o protocolo de alimentação das micotoxinas durante a gravidez, mantendo o distúrbio feminino o mais baixo possível. Foi investigado como é que o protocolo de alimentação das micotoxinas durante a gravidez e a lactação influenciaria o número efetivo de fêmeas e ninhadas. Resumidamente, fêmeas C57BL6/J de 6 a 8 semanas de idade foram previamente injetadas intraperitonealmente com gonadotrofina sérica de égua grávida (PMSG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) para sincronizar a ovulação e depois foram cruzadas com os machos. As fêmeas com secreção vaginal foram alimentadas com *pellets* de gelatina contendo 400 µg/kg de AFB1 diluída em DMSO (animais tratados, n = 3) ou com o veículo DMSO (grupo de controlo, n = 3), durante a gravidez (a partir do 11º dia de gestação) e durante os períodos de lactação.

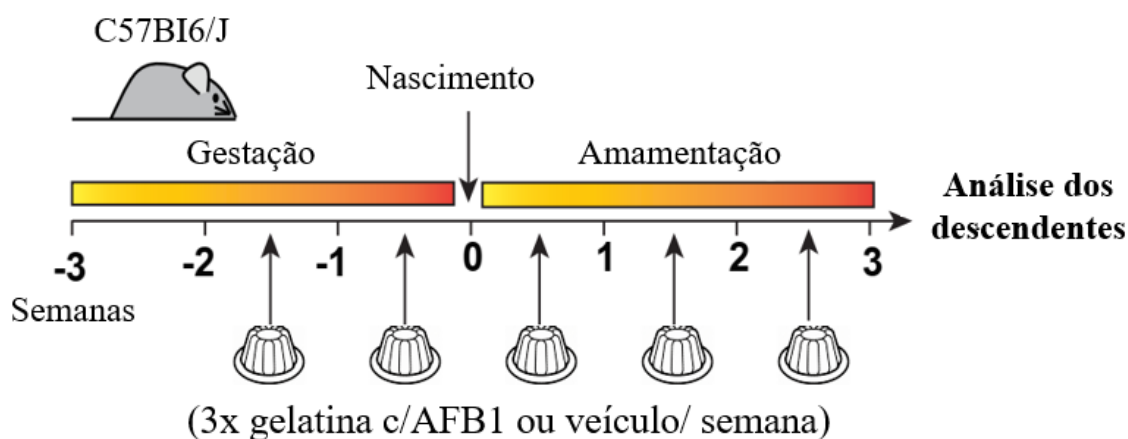


Figura 13: Otimização da autoalimentação da AFB1 nas fêmeas grávidas

As fezes dos descendentes de ambas as fêmeas, tratadas e controlo, foram colhidas e o DNA fecal foi extraído e purificado. Na Tabela 10 encontra-se a identificação das ninhadas dos ratinhos descendentes e a respetiva identificação das amostras das fezes recolhidas.

Tabela 10: Identificação das amostras de DNA de fezes de ratinho

Ninhada	ID mãe	Tratamento	Género	ID ratinho	Nº amostra
1	01593_1	DMSO	F1	1	1
			F2	2	2
			F3	3	3
			M1	4	4
			M2	5	5
2	01594_1	AFB1	F1	1	6
			F2	2	7
			M1	3	8
			M2	4	9
			M3	5	10
3	01593_4	DMSO	F1	1	11
			F2	2	12
			M1	3	13
			M2	4	14
			M3	5	15
			M4	6	16
			M5	6+1	17
4	01594_2	DMSO	F1	1	18
			F2	2	19
			F3	3	20
			F5	5	21
			F6	6	22
			M1	6+1	23
			M2	6+2	24
			M3	6+3	25
5	01594_4	AFB1	F1	1	26
			F2	2	27
			M1	4	28
			M2	5	29
			M3	6	30
			M4	6+1	31
			M5	6+2	32

(Continua na página seguinte)

Tabela 10: Identificação das amostras de DNA de fezes de ratinho (continuação)

Ninhada	ID mãe	Tratamento	Género	ID ratinho	Nº amostra
6	00497_3	AFB1	F1	1	33
			F2	2	34
			F3	3	35
			F4	4	36
			F5	5	37
			M1	6+1	38
			M2	6+2	39

4.2. Extração e purificação do DNA fecal

A amplificação das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA foi efetuada nas condições descritas na Metodologia Experimental (secção 3.7 e 3.8). Para verificar a extensão da amplificação dos fragmentos de DNA de cada amostra, bem como a sua integridade, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose, antes de se realizar a purificação do DNA amplificado e após esse processo, como ilustrado na Figura 14.

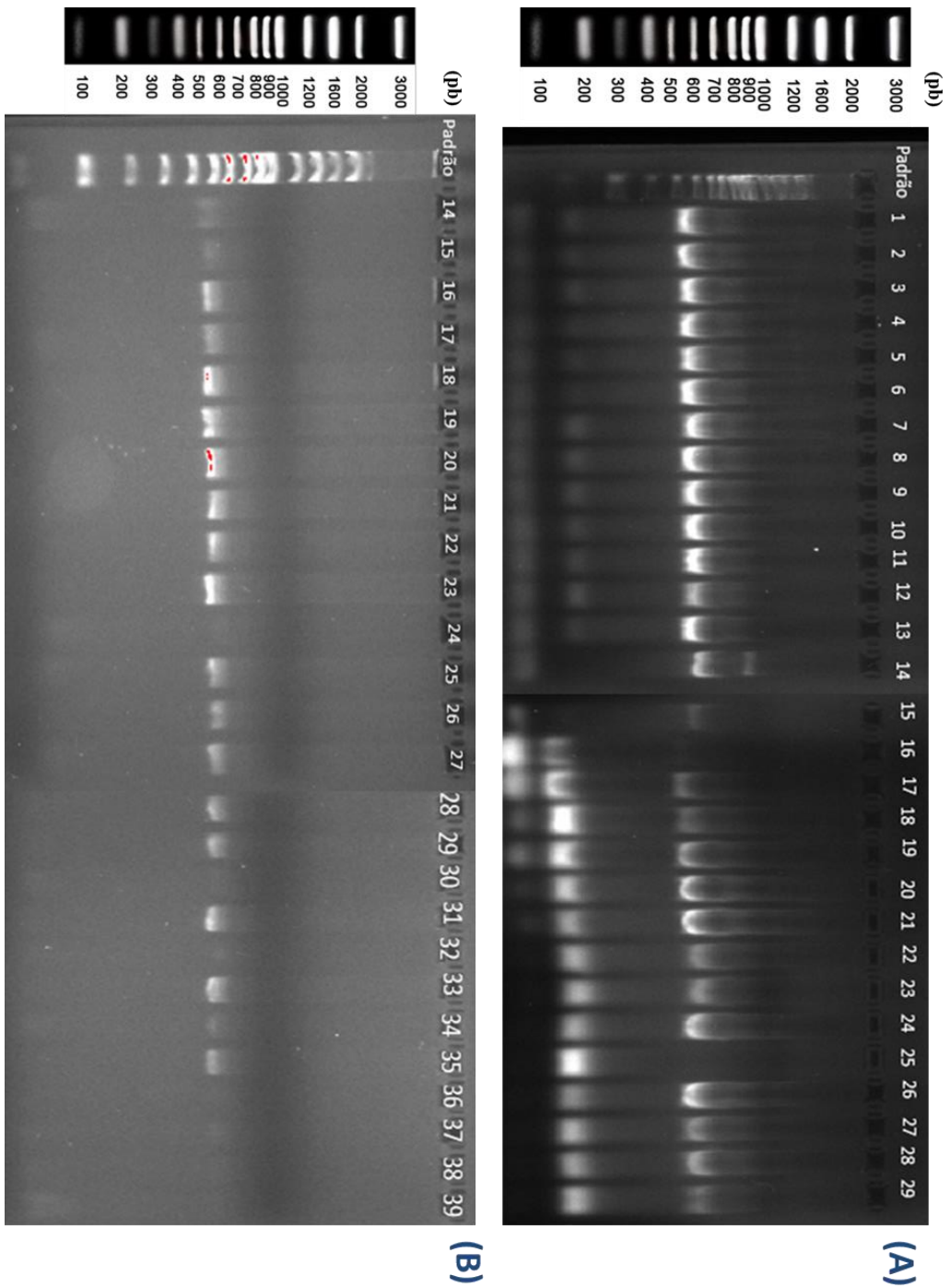


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose antes (A) e após a purificação do DNA amplificado (B)

A quantificação do DNA é uma etapa crítica na preparação das amostras que permite garantir o desempenho ideal dos ensaios laboratoriais (Blatter, 2018). Neste trabalho **quantificou-se o DNA por fluorimetria**, utilizando o fluorómetro Quantus e o kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Este kit contém um corante fluorescente de ligação ao DNA que permite a quantificação sensível de pequenas quantidades de DNA de cadeia dupla (dsDNA) em solução; como tem ligação mínima a DNA de cadeia simples, RNA, proteínas e compostos interferentes, permite a quantificação específica do dsDNA (Lienhard & Schäffer, 2019; Corporation, 2021b), compatível com a sua utilização posterior na normalização das bibliotecas para NGS. Os resultados obtidos da concentração de DNA das amostras, após purificação, encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: Concentração do DNA original (ng/μL) obtido por fluorimetria

Amostra	[DNA] após purificação (ng/μL)
1	14,50 ± 0,50
2	30,00 ± 0,00
3	19,00 ± 1,00
4	20,00 ± 0,00
5	16,50 ± 0,50
6	22,5 ± 0,50
7	21,00 ± 1,00
8	30,00 ± 0,00
9	19,00 ± 0,00
10	14,50 ± 0,50
11	19,00 ± 0,00
12	23,00 ± 0,00
13	2,20 ± 0,07
14	3,21 ± 0,06
15	0,41 ± 0,01
16	16,00 ± 0,00
17	33,00 ± 0,00
18	35,50 ± 3,50
19	29,50 ± 0,50
20	29,50 ± 0,50
21	6,55 ± 0,65
22	20,00 ± 1,00
23	33,00 ± 2,00
24	8,65 ± 0,55

(Continua na página seguinte)

Tabela 11: Concentração do DNA original (ng/μL) obtido por fluorimetria (continuação)

Amostra	[DNA] após purificação (ng/μL)
25	24,00 ± 2,00
26	20,50 ± 2,50
27	16,00 ± 0,00
28	9,10 ± 0,20
29	25,00 ± 1,00
30	20,50 ± 0,50
31	31,00 ± 2,00
32	14,00 ± 1,00
33	18,50 ± 2,50
34	25,00 ± 0,00
35	30,50 ± 0,50
36	32,50 ± 2,50
37	41,00 ± 1,00
38	20,50 ± 3,50
39	11,50 ± 0,50

Globalmente, o valor da concentração de DNA das ninhadas tratadas com a AFB1 variou entre 9,1 e 41 ng/μL; relativamente às ninhadas controlo, a concentração de DNA variou entre 0,4 e 35,5 ng/μL.

4.3. Sequenciação massiva de elevado rendimento

Após preparação das bibliotecas, efetuou-se a **sequenciação massiva de elevado rendimento** na plataforma **Illumina Miseq**. Foram analisadas todas as amostras tratadas (ou seja, cujas fêmeas tinham ingerido a dieta com AFB1): 6, 7, 8, 9, 10, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39; e as amostras controlo, com DMSO.

Os resultados permitiram a determinação da abundância relativa dos vários taxa bacterianos presente nas diferentes ninhadas, tratadas e controlo, ilustrado nas Figuras 15, 16 e 17 para o filo, género e espécie, respetivamente.

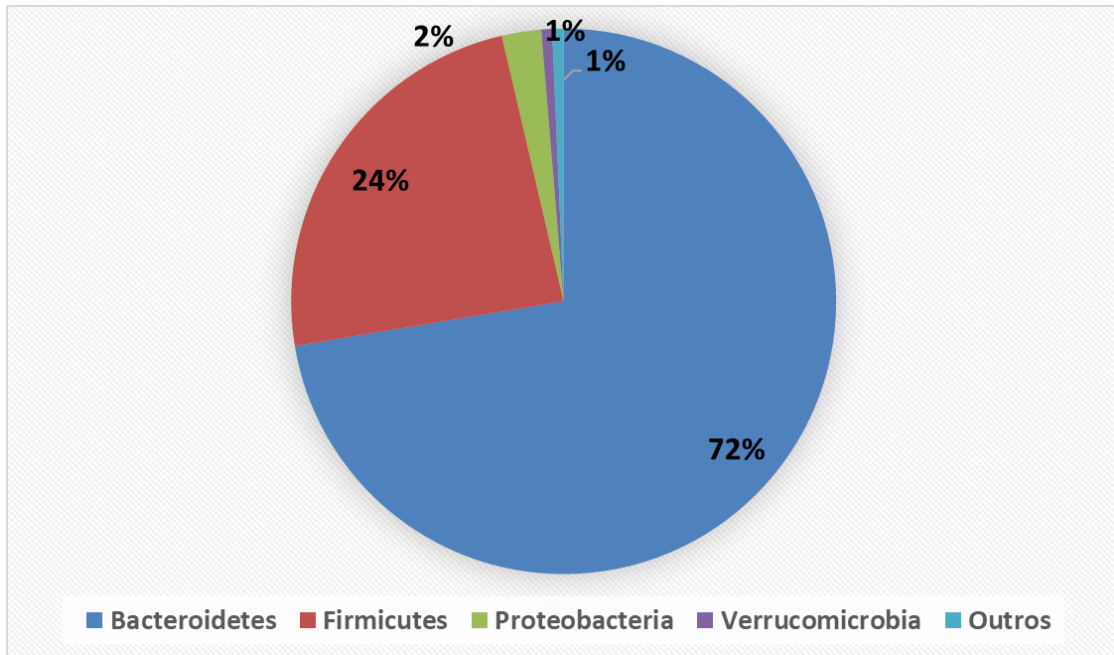


Figura 15: Abundância relativa (%) dos taxa bacterianos relativos ao Filo



Figura 16: Abundância relativa (%) dos taxa bacterianos relativos ao Género

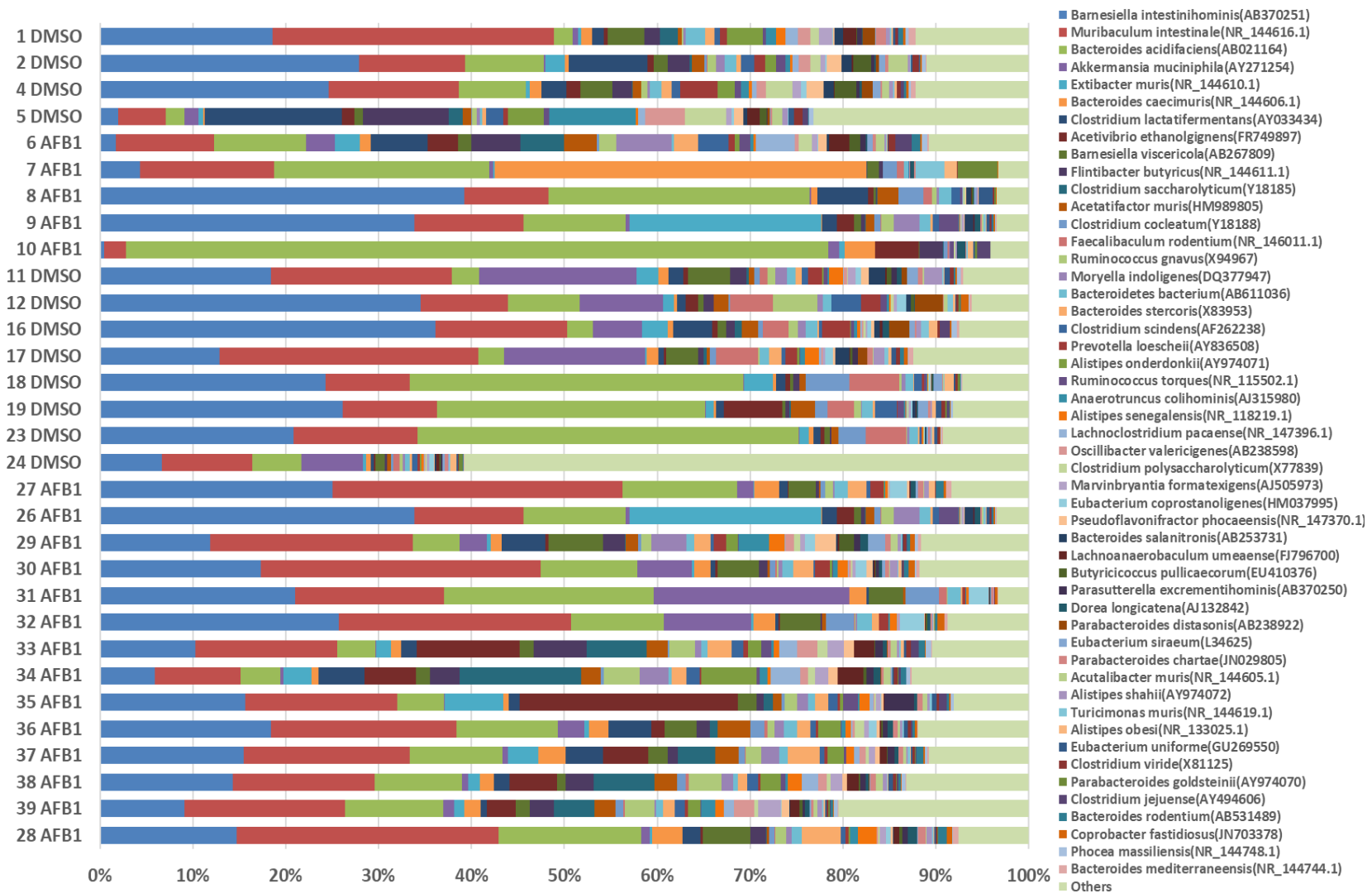


Figura 17: Abundância relativa (%) dos taxa bacterianos relativos à Espécie

A abundância relativa dos diferentes taxa bacterianos permite comparar a diferente distribuição entre os dois tipos de ninhadas estudadas (controlo e tratadas com a aflatoxina). Esta análise permite relacionar se a exposição materna à AFB1 pode constituir uma ameaça à saúde, ou seja, se existe, de facto, alteração no padrão do microbioma dos descendentes das ninhadas e qual é a consequência disso, uma vez que, consoante as espécies bacterianas presentes no microbioma dos ratinhos, estas podem produzir alterações no desenvolvimento do sistema imunitário gastrointestinal e na microbiota infantil.

Ao nível do filo (Fig.15), observou-se uma abundância relativa de 72% para os *Bacteroidetes*, 24% para os *Firmicutes*, 2% de *Proteobacteria* e 1%, tanto para o filo *Verrucomicrobia* como para a flora bacteriana considerada como “outros” (designação genérica correspondente a uma abundância relativa < 1%).

De facto, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* representam os dois filos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respetivamente, predominantes no intestino de um adulto saudável, correspondendo a > 98% das sequências de rRNA 16S detectadas na microbiota intestinal (Thomas et al., 2011; Gibiino et al., 2018).

Os *Bacteroidetes* são considerados os principais responsáveis pela homeostase intestinal, representando cerca de 7.000 espécies diferentes e colonizando vários ambientes ecológicos distintos. São descritos como microrganismos comensais, mutualistas ou mesmo patobiontes, pois também podem estar associados à progressão de doenças inflamatórias intestinais; interagem com o hospedeiro principalmente através de: **(i)** secreção de glicoproteínas; **(ii)** produção de SCFAs; **(iii)** produção de toxinas e mimetismo molecular; **(iv)** inúmeras funções metabólicas no que diz respeito à digestão e absorção de nutrientes, influenciando a função digestiva; **(v)** modulação imunológica (ou seja, ativação da inflamação e influência em doenças autoimunes); **(vi)** influência na síndrome metabólica, no comprometimento do humor e distúrbios neurológicos (Thomas et al., 2011; Gibiino et al., 2018). Para além disto, não se conhece exatamente o papel deste filo no “eixo intestino-cérebro”, mas supõe-se que possam contribuir potencialmente com a formação de produtos microbianos neurotóxicos e pró-inflamatórios na neuro degeneração inflamatória, como certos tipos específicos de LPS e endotoxinas microbianas, produção de substância amiloide

etc. Alguns géneros pertencentes a este filo incluem *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* e *Prevotella* (Gibiino et al., 2018).

O filo *Firmicutes* é composto por mais de 200 géneros bacterianos diferentes - *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Ruminococcus* - sendo o género *Clostridium* aquele que é maioritário, representando 95% desse filo (Rinninella et al., 2019). Incluem espécies de bactérias estudadas extensivamente como *Bacillus subtilis*, mas também microrganismos patogénicos importantes, por exemplo, *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* etc. (Megrian et al., 2020). Os membros deste filo são altamente diversos na morfologia, fisiologia e características de coloração de Gram; ocupam uma grande variedade de habitats e podem ser úteis ou prejudiciais na saúde humana e animal (Haakensen et al., 2008); na microbiota intestinal podem fermentar hidratos de carbono numa variedade de SCFAs, e a falta desses pode levar à diminuição da função de barreira intestinal (Gu et al., 2010). Por exemplo, em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), a diminuição da quantidade de bactérias pertencentes a este filo foi associada à redução na função de proteção da mucosa intestinal. Esses estudos sugerem que este filo, como protetor do intestino, merece atenção e estudos mais aprofundados (Y. Huang et al., 2018).

Relativamente ao **género** (Fig. 16), aqueles que se destacam por terem uma abundância relativa maioritária são, em primeiro lugar, o género *Barnesiella*, seguido dos *Bacteroides*, *Clostridium_XIVa*, *Eisenbergiella* e *Akkermansia*. As **espécies** maioritárias resultantes desta análise (Fig. 17) foram: *Barnesiella intestinihominis*, *Muribaculum intestinale*, *Bacteroides acidifaciens*, *Akkermansia muciniphila*, *Extibacter muris*, *Bacteroides caecimuris* e *Clostridium lactatifermentans*.

Em estudos anteriores, o género *Barnesiella* – comensal do cólon humano - tem sido identificada maioritariamente em populações que vivem em países desenvolvidos e tem sido correlacionada a **efeitos benéficos no intestino humano** (Mancabelli et al., 2017). Nomeadamente, é destacado o papel deste género na redução da colonização intestinal por *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), regulando a composição da microbiota e otimizando a sobrevivência do hospedeiro (Ubeda et al., 2013).

Particularmente, *Barnesiella intestinihominis*, que está ligeiramente aumentada nas amostras toxinogénicas, comparativamente às amostras controlo (mas que no geral está sobre representada no microbioma dos ratinhos), é frequentemente associada a **mecanismos protetores intestinais nos humanos**, principalmente por ter genes para produção de SCFAs como acetato, propionato e butirato, mas igualmente por contribuir para a **minimização da colonização por microrganismos patogénicos** (Fielding et al., 2019). *B. intestinihominis* DSM 21032 desempenha um papel fundamental na inibição da taxa de crescimento da espécie *Clostridium difficile*, provavelmente por um mecanismo não metabólico, uma vez que estas duas bactérias crescem em meios diferentes e têm necessidades metabólicas distintas. Os autores sugerem que *B. intestinihominis* pode ser potencialmente usada como um probiótico para tratar ou prevenir a infeção por este membro do género *Clostridium* (Steinway et al., 2015). Para além disso, também se levantou recentemente a hipótese de que pode prevenir o sobrecrescimento de microrganismos patogénicos por estimulação de uma resposta antimicrobiana do hospedeiro. Especificamente, pode ativar a sinalização dos TLRs das células do hospedeiro, que **ativam a produção de péptidos antimicrobianos**. Por exemplo, esta espécie bacteriana tem capacidade de estimular vias de biossíntese de LPS que já demonstraram estimular a resposta imune inata do hospedeiro, através da sinalização dos TLRs e produção de lectinas bactericidas (Steinway et al., 2015). Outra particularidade desta espécie é que tem sido relacionada com a **estimulação sinérgica da imunidade local e sistémica** para melhorar os efeitos terapêuticos anticancerígenos das ciclofosfamidas, ao estimular a atividade do sistema imunológico contra as células tumorais, limitando os efeitos pró-apoptóticos diretos nas células epiteliais e a sua acumulação *in vivo*. Por outras palavras, as estirpes desta espécie demonstraram controlar a eficácia da ciclofosfamida quimioterápica em ratos, induzindo a produção de IFN- γ pelas células T $\gamma\delta$ no local do tumor (Li et al., 2019; Palmisano et al., 2020; Dutta & Lim, 2020). Embora este mecanismo tenha sido comprovado em modelo murino, pode conjecturar-se que, possivelmente, possa ocorrer em humanos, embora esta hipótese necessite de ser testada com mais estudos (Limeta et al., 2020).

O género *Muribaculum* inclui membros altamente diversos e dominantes da microbiota intestinal de ratos e, os estudos baseados no seu genoma, indicam o potencial deste

microrganismo para degradar hidratos de carbono complexos (Eberl et al., 2020). Entre eles, *Muribaculum intestinale*, uma espécie bacteriana estritamente anaeróbia e um membro dominante da comunidade bacteriana intestinal, também confere **função de proteção no microbioma**, uma vez que é conhecido por inibir, num modelo murino, a colonização por um agente patogénico para o Homem, *Salmonella enterica serovar* Typhimurium (Brugiroux et al., 2016; Dowden et al., 2020). *M. intestinale* está geralmente associado a um fenótipo saudável e, portanto, prevê-se que exiba comportamento comensal, encontrando-se frequentemente diminuído na doença de Crohn, uma das principais doenças inflamatórias intestinais (Dobranowski et al., 2019). Eberl et al. (2020) provaram que esta espécie bacteriana admite uma colonização lenta quando é inoculada em ratinhos *germ-free*. Como se sabe, o potencial de oxidação/redução intestinal é normalmente aumentado em ratinhos *germ-free* em comparação com ratinhos convencionais, mas torna-se reduzido em resposta à colonização com uma microbiota complexa. Como *M. intestinale* é um anaeróbio estrito, prevê-se que o elevado potencial de oxidação/redução no intestino daqueles ratinhos pode inibir a sua colonização logo após a inoculação. Isto significa que, muito provavelmente, em humanos, este microrganismo coloniza o intestino infantil algum tempo após o nascimento, quando o oxigénio já foi reduzido pelos colonizadores facultativos iniciais (Eberl et al., 2020). No entanto, esta é uma espécie que ainda é relativamente pouco estudada, e portanto, o papel específico que possa desempenhar na fisiologia intestinal, de ratos ou humanos, ainda não foi determinado.

Embora a abundância relativa das duas espécies bacterianas descritas anteriormente tenha sido ligeiramente aumentada com a exposição à micotoxina, neste caso, não parece haver efeitos negativos desse aumento, uma vez que, tanto *B. intestinihominis* como *M. intestinale* parecem ser, segundo a literatura bibliográfica, inofensivos, conferindo efeitos protetores no microbioma intestinal e reduzindo a proliferação de outros microrganismos patogénicos; assim, **o aumento da sua colonização provocada pela AFB1, provavelmente, não produzirá danos colaterais no intestino fetal.**

Em relação ao género *Bacteroides*, anaeróbio obrigatório, Gram-negativo e os principais constituintes da microbiota, são predominantes no trato intestinal humano inferior,

vivendo e crescendo exclusivamente no TGI dos mamíferos, perfeitamente adaptados à vida no intestino. Como comensais e mutualistas, os membros deste género podem estabelecer associações estáveis e de longo prazo com os seus hospedeiros humanos e conferir inúmeros benefícios à saúde (Aaron & Goodman, 2017). Têm uma importante capacidade de degradar glicanos e reconhecer e metabolizar diversos polissacáridos derivados de plantas e hospedeiros, através de agrupamentos de genes denominados PULs. As mudanças no seu perfil transcricional para consumir glicanos são provavelmente um fator importante que permite que estas bactérias colonizem inicialmente o intestino, durante a infância, e persistam lá ao longo da nossa vida (Aaron & Goodman, 2017).

Em especial, observa-se na Figura 16 que *Bacteroides acidifaciens* tem uma abundância relativa significativa, **tanto nas ninhadas controlo como nas ninhadas em que foi introduzida a AFB1 na dieta materna**. A sua predominância seria expectável nos controlos, uma vez que é uma espécie dominante no microbioma intestinal, ajudando na digestão dos alimentos e a produzir nutrientes e energia valiosos de que o corpo necessita; tem igualmente a capacidade de tolerar e reduzir os níveis de oxigénio - permitindo assim o crescimento de anaeróbios estritos que, de outra forma, seriam mortos pela presença de O₂ - sendo a principal razão pelo qual consegue disseminar-se para novos hospedeiros e talvez seja também a razão pela qual esta espécie está tão difundida entre os mamíferos.

No entanto, os resultados sugerem que esta espécie bacteriana também permanece bastante elevada nas amostras toxinogénicas, de forma idêntica aos controlos. Provavelmente, isto pode acontecer por dois motivos: **(i)** por ser uma **espécie resistente a esta aflatoxina**, uma vez que conseguiu proliferar significativamente de maneira semelhante ao seu desenvolvimento nos ratinhos controlo, o que quer dizer que a sua colonização não foi influenciada de forma negativa pela ingestão materna da AFB1, continuando a exercer os seus efeitos benéficos nos descendentes; **(ii)** por ser uma espécie que exerce diversos mecanismos protetores no hospedeiro e que, dessa forma, pode colonizar para atenuar os eventuais efeitos prejudiciais provocados pela exposição à AFB1.

Por exemplo, Gurung et. al (2020) demonstraram que *B. acidifaciens* melhorou a **intolerância à glicose e a resistência à insulina**, desempenhando assim um papel benéfico

no metabolismo da glicose em humanos e animais (Gurung et al., 2020). Ao mesmo tempo, esta espécie ativa a DPP-4 no intestino e, subsequentemente, aumenta o GLP-1, o que pode contribuir para a homeostase da glicose e sugere um potencial papel **probiótico**; por outro lado, também melhora a oxidação dos ácidos gordos no tecido adiposo. Assim, pode auxiliar na prevenção de doenças metabólicas, como a obesidade, e na melhoria da sensibilidade à insulina (Gurung et al., 2020; J. Y. Yang et al., 2017). Para além disso, está comprovado que as estirpes comensais de *Bacteroides acidifaciens* **promovem a produção de IgA** – a imunoglobulina essencial para a defesa da mucosa intestinal contra microrganismos patogénicos nocivos - no intestino grosso de ratos. Especificamente, induzem a expressão da citidina desaminase através da sua ativação, sendo esta enzima crucial para a recombinação de troca de classe de IgM para IgA no intestino grosso. Assim, **podem melhorar e reforçar a função imunológica intestinal**, reduzindo o aparecimento de doenças inflamatórias intestinais (Nakajima et al., 2020; J. Y. Yang et al., 2017).

É conhecido que a barreira intestinal é organizada como um sistema complexo de multicamadas que permite a absorção de nutrientes, enquanto evita a translocação de microrganismos patogénicos e dos seus produtos. A rutura desta barreira conduz ao trânsito de conteúdos luminiais para a corrente sanguínea, como microrganismos patogénicos e xenobióticos, ativando a resposta imune e induzindo inflamação. O muco cobre a camada externa das células epiteliais do intestino e serve como proteção física contra a penetração de microrganismos e compostos nocivos (Ouyang et al., 2020). A espécie *Akkermansia muciniphila*, considerada um **biomarcador para a saúde intestinal** e superabundante na microbiota intestinal humana foi identificada nos 2 grupos de ninhadas em estudo. Utiliza muco (mucina) como única fonte de carbono, azoto e energia - convertendo este polímero em acetato e propionato - sendo a sua **atividade central degradar esse muco**, utilizando o seu repertório particularmente vasto de enzimas mucolíticas codificadas no seu genoma, incluindo sulfatases e glicosídeos hidrólases como as α -fucosidases, α -sialidases e β -galactosidases (Geerlings et al., 2018; Kostopoulos et al., 2020). Uma vez que as mucinas que a bactéria degrada, são os principais componentes orgânicos das camadas de muco que protegem o epitélio dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário contra microrganismos

patogênicos e danos mecânicos, significa que esta espécie bacteriana pode ter efeito benéfico na saúde, provavelmente com base na **regulação da espessura do muco e integridade da barreira intestinal, mas também na modulação do sistema imunológico** (Ouyang et al., 2020; Trastoy et al., 2020). Estudos recentes descreveram que o ácido butírico produzido pela *A. muciniphila* poderia promover as células β pancreáticas a segregar insulina, regulando a glicemia, para além de que, a sua proteína de membrana externa (Amuc-1100) demonstrou ter capacidade de bloquear a passagem de toxinas para o sangue, bem como efeitos na prevenção da obesidade e outras comorbidades associadas; parece também reduzir o desenvolvimento de massa gorda, resistência à insulina e dislipidemia em ratos, bem como ativar o *Toll-like receptor 2* (TLR2) para regular respostas imunes do hospedeiro (Cani & de Vos, 2017; Z. Li et al., 2020). Por outro lado, *A. muciniphila* influencia igualmente genes envolvidos no metabolismo celular dos lípidos, desempenha um papel na normalização da endotoxemia metabólica e do metabolismo do tecido adiposo (Geerlings et al., 2018). Cani et al. (2017) comprovaram que a sua administração como **probiótico (i)** reestabeleceu a produção endógena de péptidos antimicrobianos; **(ii)** aumentou a produção endógena de lípidos bioativos específicos que pertencem à família dos endocanabinóides e são conhecidos por terem atividades anti-inflamatórias, regulando a produção endógena de péptidos intestinais envolvidos na regulação da glicose e da barreira intestinal, respectivamente, o péptido semelhante à glucagina 1 e 2 (GLP-1 e GLP-2) (Cani & de Vos, 2017). Ashrafian et al. (2019) provaram ainda, num estudo em células Caco-2 (linha celular imortalizada de células do adenocarcinoma colorretal humano), que *A. muciniphila* aumentou o número de células caliciformes e secreção de muco; aumentou significativamente a expressão dos TLR2 e TLR4 e ainda a expressão das proteínas das TJ, envolvidas na estabilidade da barreira intestinal (Ashrafian et al., 2019).

Além disso, exhibe outras múltiplas funções biológicas, incluindo inibição da inflamação e alimentação cruzada, denominada sintrofia, em conjunto com outras espécies da microbiota, podendo contribuir para a expansão de outros microrganismos benéficos, ao mesmo tempo que pode ter um efeito direto sobre o metabolismo do hospedeiro e, ainda,

reduzir a colonização por espécies potencialmente patogénicas (Dao et al., 2016; Ashrafian et al., 2019).

Esta bactéria Gram-negativa está presente no trato intestinal em diferentes fases da vida; a sua colonização tem início na infância e atinge 1–4% da microbiota fecal na idade adulta (Ouyang et al., 2020); tem a capacidade de **degradar as estruturas dos HMOs** em açúcares mais simples, libertando SCFAs (acetato e propionato); esta utilização de HMOs, usando o leite humano como única fonte de energia, pode explicar a sua presença no leite materno e no tecido mamário de mulheres/animais lactantes. Esta sua presença específica no leite humano pode beneficiar a **maturação do estabelecimento da microbiota do bebé e a maturação imunológica**, uma vez que, como referido, se sugere que a sua proteína externa esteja envolvida na regulação imune. Mais, a sua capacidade de degradação de polissacáridos já demonstrou ter um papel importante na colonização inicial do intestino do bebé, tendo assim um grande impacto na vida posterior, garantindo a saúde e metabolismo da mucosa. Portanto, a sua presença no intestino infantil pode ser considerada um **marcador para o desenvolvimento e diversidade da microbiota intestinal** (Geerlings et al., 2018).

Pela observação dos resultados, esta espécie tem uma abundância ligeiramente superior nas ninhadas controlo, comparativamente às ninhadas tratadas; isto seria de esperar, uma vez que, posto tudo o que foi referido anteriormente, é frequentemente designada como a “sentinela do intestino”, considerada o microrganismo mais próximo das células epiteliais (Ashrafian et al., 2019; Ouyang et al., 2020). Uma vez que os resultados demonstram uma **redução da sua abundância após a exposição à AFB1** (embora muito ligeira), isso significa que, nos ratinhos cuja mãe ingeriu a AFB1 na dieta, **pode ficar comprometida a integridade da monocamada de enterócitos, diminuição da modulação do sistema imunológico intestinal, bem como, a desregulação da espessura do muco.**

O género *Clostridium* é predominante no nosso TGI, constituindo cerca de 10–40% do total de bactérias; os membros deste género colonizam numa fase precoce da vida, podendo ser detetados nas fezes na primeira semana após o nascimento (P. Guo et al., 2020). As espécies deste género exercem muitos benefícios para a saúde do corpo através da interação direta ou indireta com o intestino sendo, deste modo, **considerados reguladores**

indispensáveis da homeostase intestinal e, portanto, mudanças na abundância de *Clostridium* spp. na microbiota podem afetar potencialmente a função gastrointestinal de um indivíduo (Pequegnat et al., 2013). Eles produzem SCFAs como produtos finais do metabolismo, como butirato, propionato e acetato, e estão frequentemente envolvidos na produção de ácidos biliares primários e secundários, no íleo e no cólon, que desempenham um papel vital na regulação do equilíbrio metabólico intestinal (Pequegnat et al., 2013; P. Guo et al., 2020). Já foi demonstrado igualmente que atenuam a inflamação e as doenças alérgicas de maneira eficaz, devido às suas atividades biológicas distintas, principalmente através da energização das células epiteliais intestinais, fortalecimento da barreira intestinal e interação com o sistema imunológico (P. Guo et al., 2020). Genericamente, as vantagens deste género como **potenciais probióticos** incluem o facto de **(i)** serem bactérias comensais no intestino de animais e humanos, portanto normalmente são inofensivos e não desencadeiam fortes respostas imunológicas intestinais; **(ii)** a maioria ter capacidade de esporular e resistir com sucesso em ambientes de stress; **(iii)** especialmente as espécies dos *clusters* XIVa e IV, puderem exercer efeitos anti-inflamatórios e manter a saúde intestinal através dos seus componentes e metabolitos já referidos, especialmente o butirato (P. Guo et al., 2020).

No entanto, apesar dos muitos benefícios proporcionados por algumas espécies de *Clostridium*, estas produzem exotoxinas potentes, sendo um dos géneros com as espécies mais toxigénicas conhecidas, como *C. perfringens*, *C. difficile* e *C. botulinum* (Pequegnat et al., 2013). Essas toxinas possuem uma variedade de atividades biológicas, como neurotoxicidade, atividade hemolítica e enterotoxigénica (P. Guo et al., 2020). As proteínas de ligação à fibronectina, adesina e flagelina são os principais fatores de virulência que facilitam a fixação destas bactérias e a sua aderência no intestino (Pequegnat et al., 2013). Assim, o crescimento excessivo do género *Clostridium* é frequentemente uma característica de disbiose microbiana intestinal e do aumento da permeabilidade intestinal - uma característica de doenças inflamatórias intestinais e outras, relacionadas ao sistema imunológico (Parker et al., 2020).

Especificamente, *Clostridium lactatifermentans*, que no presente trabalho se encontra representado em ambas as ninhadas controlo e tratadas com a AFB1 – embora ligeiramente superior nestas últimas - é uma bactéria que fermenta o lactato e produz SCFAs, nomeadamente acetato e propionato e também butirato e isovalerato, embora em menores quantidades. Como produtor destes SCFAs, provou-se num estudo de Wielen et al. (2002), que este microrganismo está relacionado com a **redução da colonização por *Salmonella enterica* Enteritidis**, uma causa importante de salmonelose humana nos países ocidentais; verificou-se que o crescimento de *S. Enteritidis* foi inibido pela cultura mista de *Lactobacillus crispatus* e *C. lactatifermentans*, a pH 5,8. Ou seja, demonstrou-se que o acetato e o propionato produzidos por duas estirpes bacterianas cecais, cultivadas com lactose, inibiram o crescimento de *S. Enteritidis* (Wielen et al., 2002). No entanto, e apesar das funções benéficas protetoras intestinais descritas anteriormente, Sun et al. (2017) sugeriram que esta espécie funciona como **veículo da hiperproliferação do cancro colorretal** e que estava enriquecida nos grupos inflamatórios num modelo animal murino. Assim, a inflamação causada por bactérias intestinais também se considera ter impacto na carcinogénese, levando a danos na função de barreira intestinal, translocação bacteriana e secreção de citocinas que mantêm um ambiente inflamatório dentro do tumor (Sun et al., 2017).

Observando os resultados obtidos, este microrganismo colonizou o intestino dos ratinhos descendentes controlo de forma muito semelhante aos ratinhos que sofreram exposição materna à AFB1. Esta evidência leva a crer que o seu crescimento não foi influenciado pela micotoxina, por isso, provavelmente, **esta espécie bacteriana é resistente aos efeitos negativos provocados pelo contaminante alimentar**. *C. lactatifermentans* faz parte da microflora intestinal saudável e pode trazer benefícios ao próprio hospedeiro, destacando-se a redução da colonização por microrganismos indesejáveis entéricos.

Relativamente a todas as outras espécies bacterianas que constam na Figura 17, e que não foram destacadas anteriormente, é provável que também possam influenciar o microbioma intestinal, no entanto, não há forma de o comprovar cientificamente, uma vez que não há literatura bibliográfica suficiente que permita descrever o seu papel ao nível do

intestino. Assim, foram consideradas preferencialmente aquelas que pareceram relevantes do ponto de vista bibliográfico.

Posteriormente à análise da abundância relativa (%) dos taxa bacterianos, é importante, quando se estuda o microbioma intestinal, compreender se existem realmente diferenças na diversidade microbiana entre os diferentes grupos estudados, a fim de elucidar sobre os padrões de distribuição das comunidades intestinais existentes (Reese, 2018). Para isso, foi determinado o **índice de diversidade de Shannon (H)**. Este índice varia normalmente entre 1,5 e 3,5 e raramente atinge 4,5, aumentando à medida que a riqueza da comunidade aumenta, ou seja, um maior índice significa que o meio ambiente é mais diversificado e estável em termos de biodiversidade (Ifo et al., 2016). Desta forma, intuitivamente se compreende que uma comunidade composta por taxas ecologicamente diferentes é mais diversa do que uma comunidade composta por taxas semelhantes (Ricotta & Szeidl, 2006).

Os resultados obtidos da análise do índice de diversidade de Shannon estão representados nas Figuras 18 e 19.

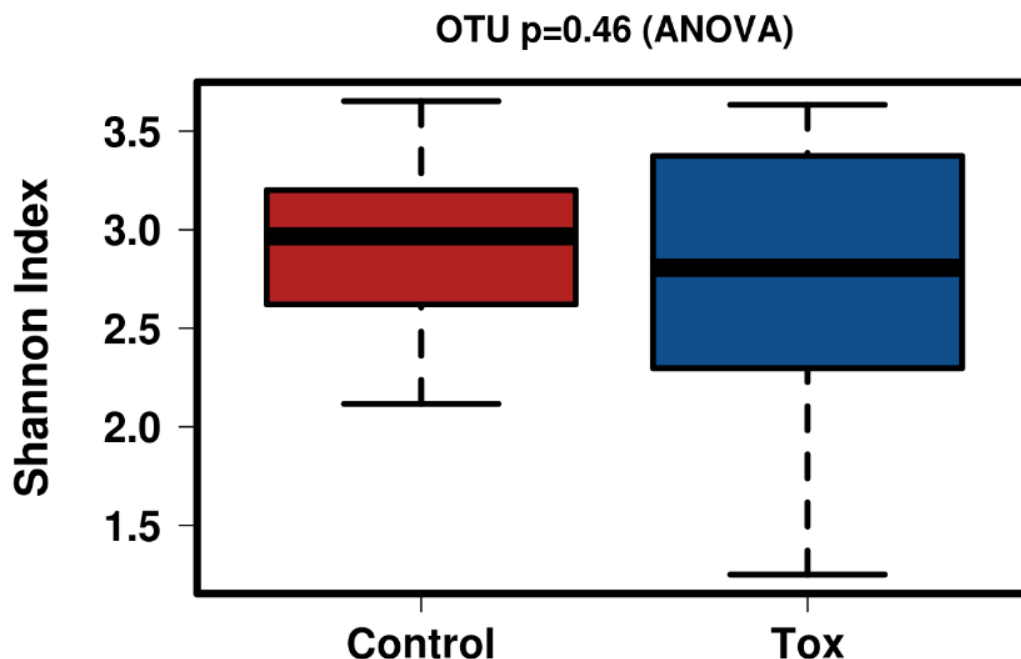


Figura 18: Esquematização do índice de Shannon para as espécies presentes nas ninhadas controlo (Control) e tratadas com a AFBI (Tox)

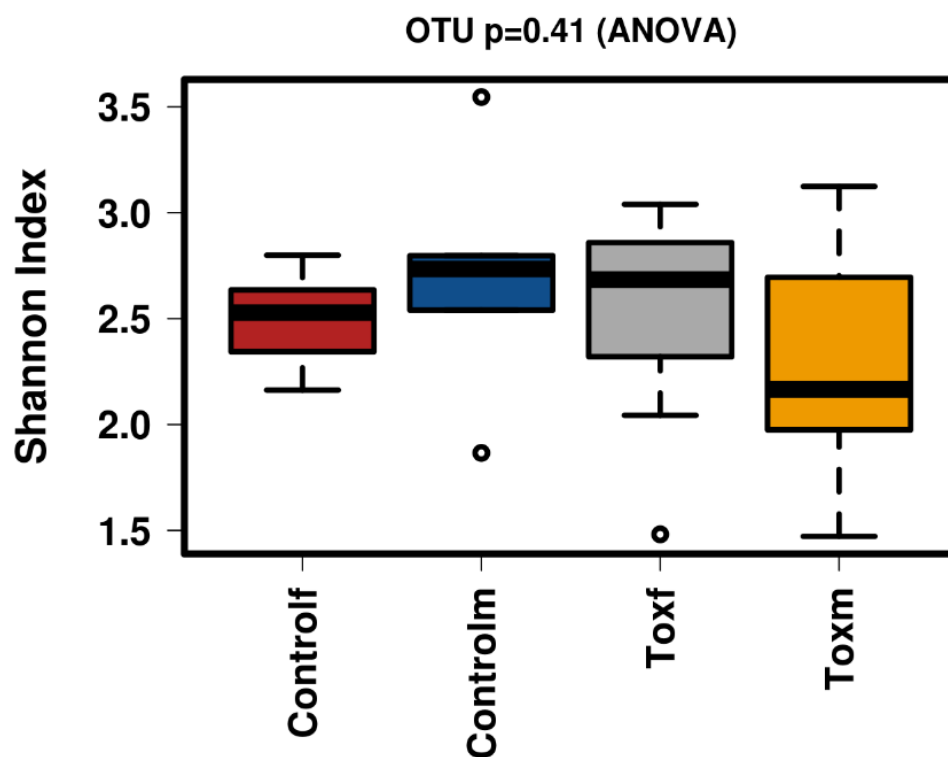


Figura 19: Esquemática do índice de Shannon para os géneros presentes nas ninhadas controlo e tratadas com a AFBI (Tox), discriminando machos (m) e fêmeas (f)

Através da observação das Figuras 18 e 19 verifica-se que, na sua globalidade, os resultados não apresentam diferenças consideráveis, tanto entre os grupos controlo e toxinogénicos, como entre machos e fêmeas. Ou seja, sugere-se que existe uma **homogeneidade na diversidade bacteriana** das amostras analisadas.

Após se ter efetuado um **tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA)**, foram detetadas diferenças significativas entre os grupos, particularmente ao nível da espécie. Este tipo de análise permite-nos decidir se as diferenças amostrais observadas são reais (causadas por diferenças significativas nas populações observadas) ou casuais (decorrentes da mera variabilidade amostral) (Bertinetto et al., 2020). Portanto, esta análise servirá, não só para identificar e distinguir as espécies bacterianas presentes nas ninhadas tratadas e controlo (discriminando também entre machos e fêmeas), mas igualmente para perceber se as diferenças encontradas nesses grupos são, de facto, significativas a nível estatístico.

Os gráficos resultantes desta análise de variância encontram-se nas Figuras 20 e 21, 22 e 23 para o género e a espécie bacteriana, respetivamente.

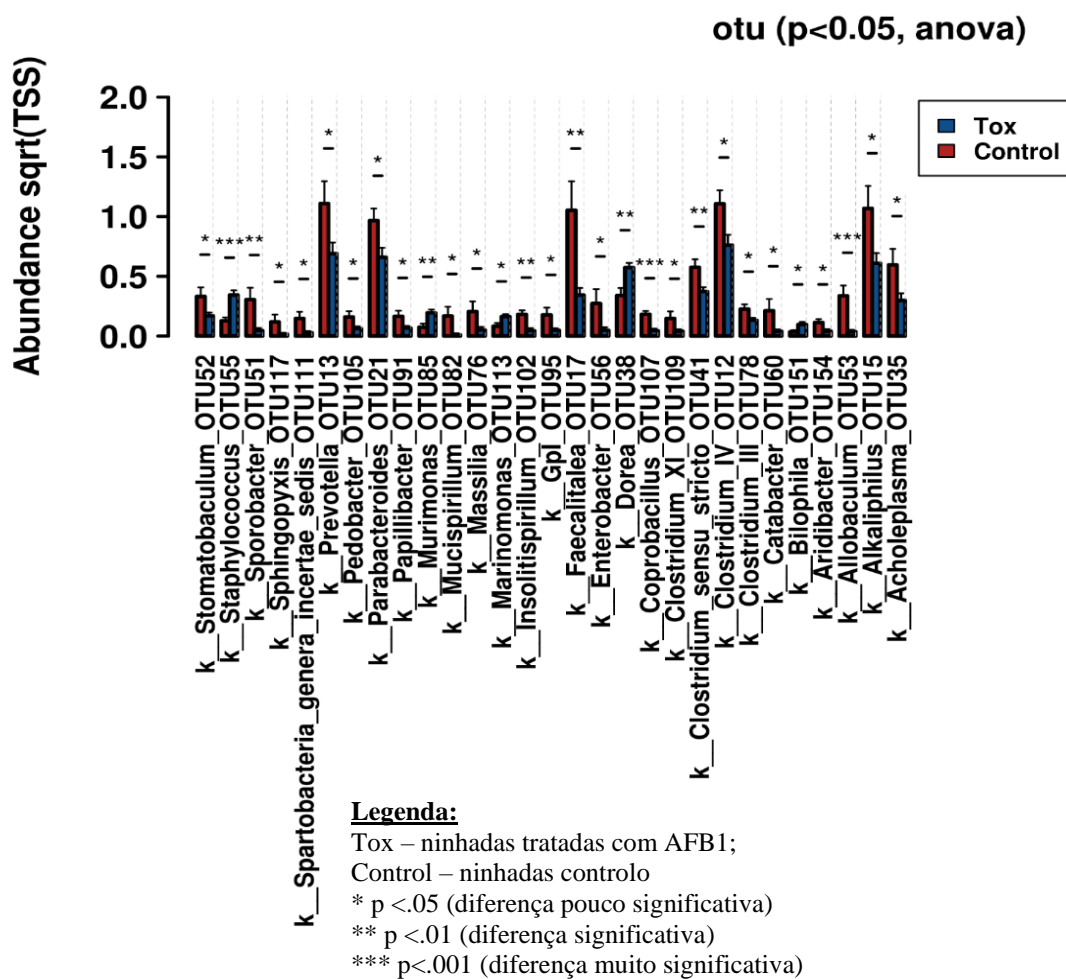


Figura 20: Abundância relativa dos diferentes géneros, das ninhadadas controlo e tratadas

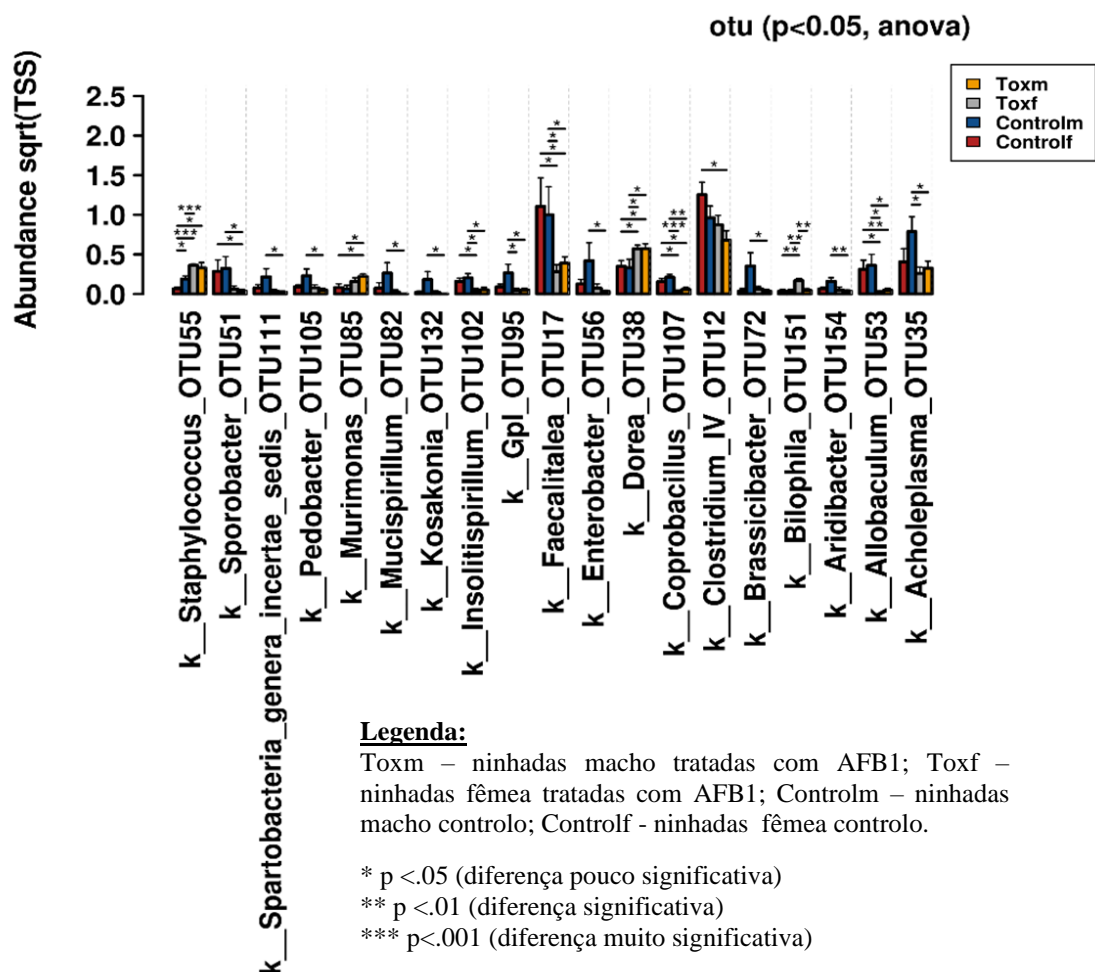


Figura 21: Abundância relativa dos diferentes gêneros, discriminando descendentes machos e fêmeas

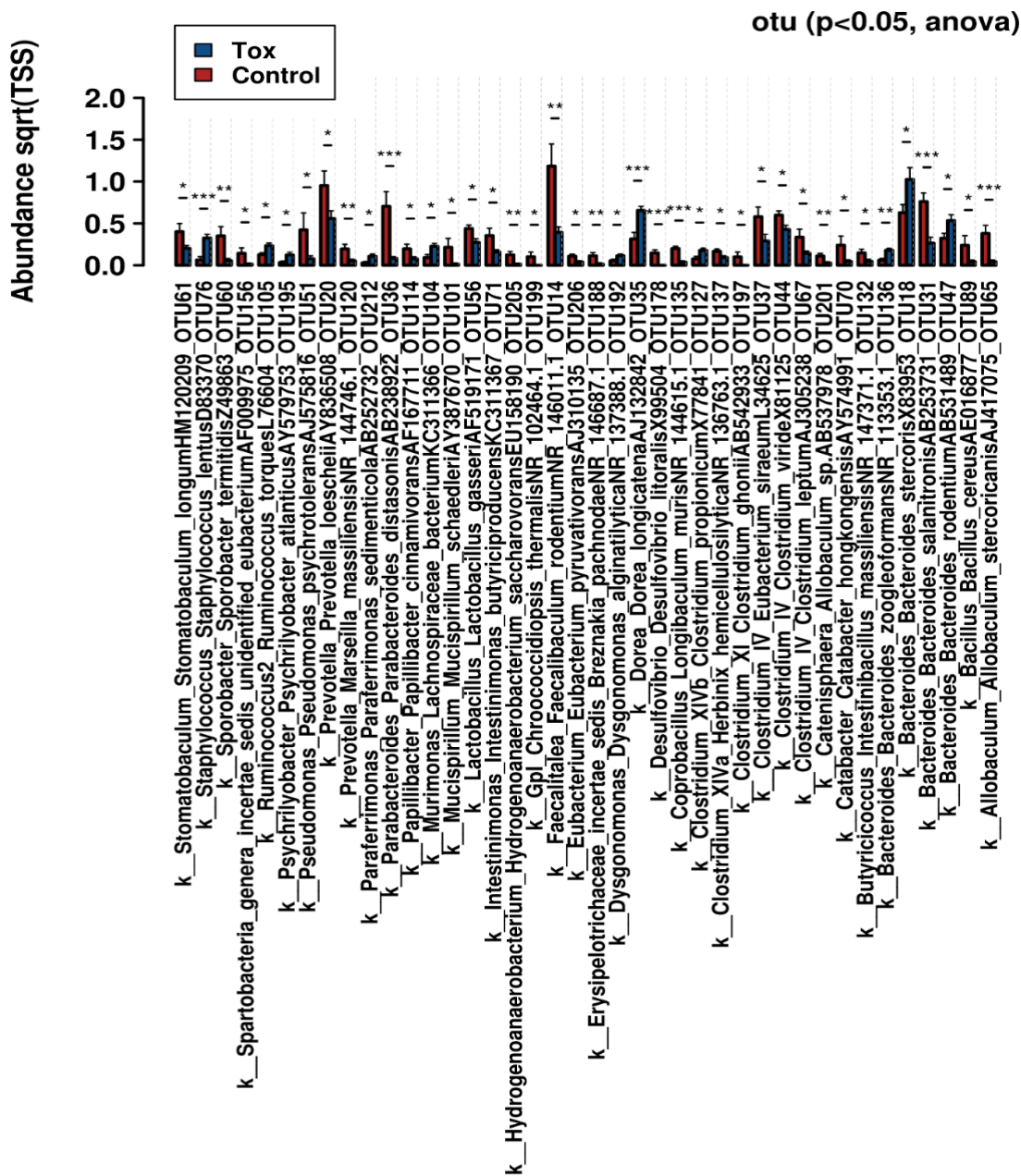


Figura 22: Abundância relativa das diferentes espécies, das ninhadas controle e tratadas

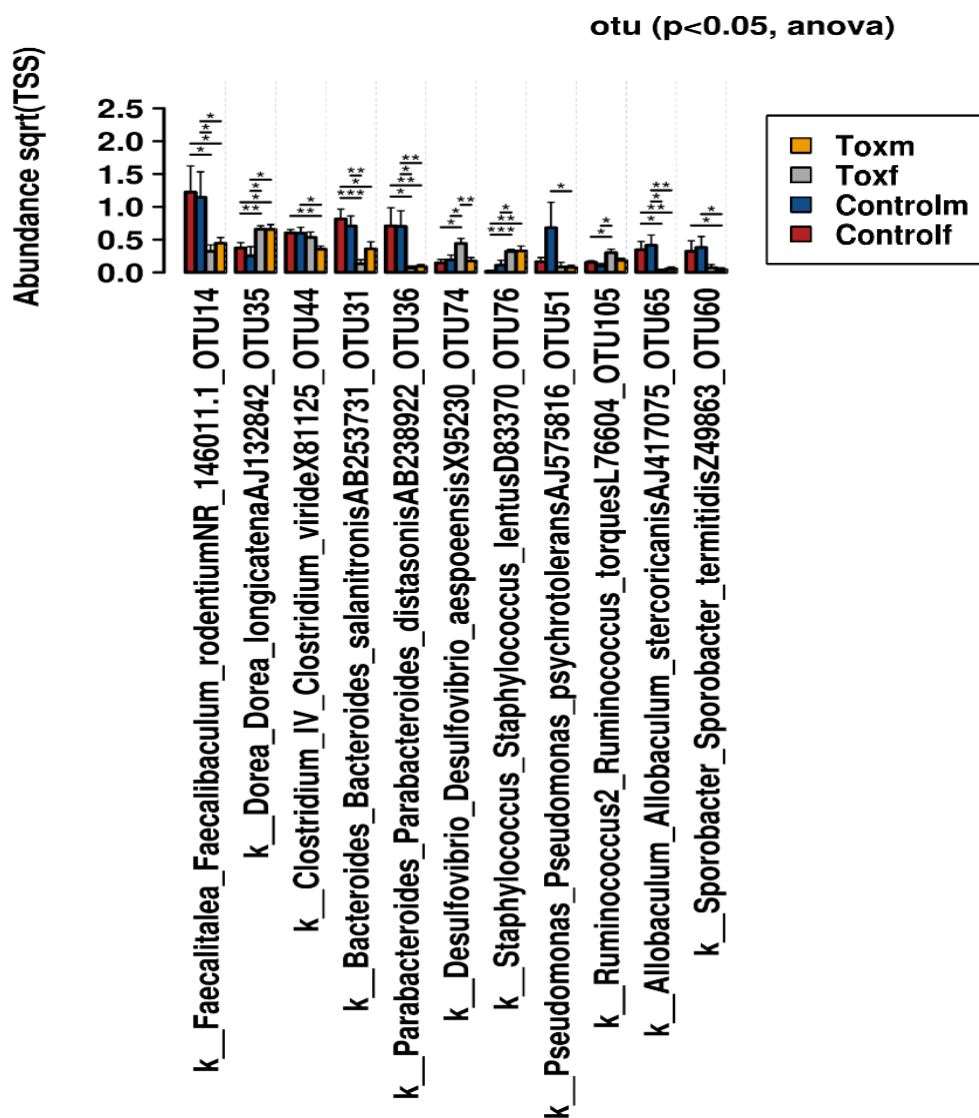


Figura 23: Abundância relativa das diferentes espécies, discriminando descendentes machos e fêmeas

Normalmente, as referências relativas às relações ou diferenças encontradas estatisticamente significativas, são dadas pela simbologia $p < .05$, $p < .01$ e $p < .001$ e correspondentes asteriscos [*; **; ***], indicando uma diferença pouco significativa, significativa ou muito significativa, respetivamente (Loureiro & Gameiro, 2011).

Observando a Figura 20, os únicos 3 géneros que mostram ter diferenças muito significativas (***) entre as ninhadas controlo e toxinogénicas são os géneros *Allobaculum* e

Coprobacillus, maioritários nos controles, e *Staphylococcus*, mais abundante nas amostras expostas à aflatoxina. Os gêneros *Sporobacter*, *Murimonas*, *Insolitispirillum*, *Faecalitalea* e *Dorea* estão presentes em ambos os grupos, com diferenças do ponto de vista estatístico (***) e os gêneros que mostram ter poucas diferenças significativas (*) entre os grupos correspondem a *Stomatobaculum*, *Sphingopyxis*, *Prevotella*, *Pedobacter*, *Parabacteroides*, *Papilibacter*, *Mucispirillum*, *Massilia*, *Marinomonas*, *Gpl*, *Enterobacter*, *Clostridium XI*, *Clostridium IV*, *Clostridium III*, *Catabacter*, *Bilophila*, *Aridibacter*, *Alkaliphilus* e *Acholeoplasma*. Relativamente à comparação entre machos e fêmeas (Fig. 21), *Staphylococcus* foi o único gênero com diferença muito significativa entre os grupos, tendo uma abundância mais elevada nos toxinogénicos, e dentro destes, ligeiramente superior nos ratinhos fêmea; nos controles, nota-se uma diferença significativa com uma maior abundância nos ratinhos macho. O gênero *Bilophila*, *Coprobacillus* e *Allobaculum* mostram diferenças significativas; o primeiro está mais elevado nas amostras toxinogénicas das fêmeas, e os dois últimos mais elevados nos descendentes controles machos. Todos os restantes gêneros apresentados nos gráficos anteriores mostram poucas diferenças a nível estatístico.

De acordo com a Figura 22, as espécies que demonstram ter diferença muito significativa (***) são: *Staphylococcus lentus* e *Dorea longicatena* (que são mais abundantes nas amostras tratadas com a AFB1), bem como *Parabacteroides distasonis*, *Desulfovibrio litoralis*, *Longibaculum muris*, *Bacteroides salanitronis* e *Allobaculum stercoricanis*, com abundância relativa superior nos ratinhos controlo, diminuindo significativamente quando é introduzida a AFB1. As espécies *Sporobacter termitidis*, *Marseilla massiliensis*, *Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans*, *Faecalibaculum rodentium*, *Breznakia pachnodae* e *Bacteroides zoogloformans* mostram diferenças significativas (**) na sua abundância entre os grupos, sendo que a última espécie é maioritária nos toxinogénicos, e todas as restantes, nos controles. Relativamente às espécies bacterianas que têm poucas diferenças a nível estatístico (*) entre as ninhadas expostas à micotoxina e as ninhadas controlo tem-se *Stomatobaculum longum*, *Ruminococcus torques*, *Psychrilyobacter atlanticus*, *Pseudomonas psychrotoletans*, *Prevotella loescheii*, *Paraferrimonas*

sedimenticola, *Papillibacter cinnamivorans*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Mucispirillum shaedleri*, *Lactobacillus gasseri*, *Intestinimonas pyruvativorans*, *Dysgonomonas alginatilytica*, *Clostridium propionicum*, *Herbiniz hemicellulosilytica*, *Clostridium ghonii*, *Eubacterium siraeum*, *Clostridium víride*, *Clostridium leptum*, *Catabacter hongkongensis*, *Intestinibacillus massillensis*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides rodentium* e *Bacillus cereus*. Comparando entre ratinhos macho e fêmea (Fig. 23), as únicas duas espécies com diferenças muito significativas são *Bacteroides salanitronis*, cuja abundância relativa é superior nos controlos e, dentro destes, nos ratinhos fêmea (todavia, também se observam diferenças no grupo tratado com a AFB1, sendo mais abundante nos ratinhos macho) e *Staphylococcus lentus*, que prevalece nos ratinhos expostos à micotoxina, mas cujas diferenças entre sexos se observam mais nos controlos, sendo maioritário nos ratinhos macho. Todas as restantes espécies bacterianas mencionadas anteriormente demonstram poucas diferenças significativas entre sexos masculino e feminino.

O género *Staphylococcus* é constituído por bactérias Gram-positivas, na maioria anaeróbios facultativos, membros colonizadores comensais das membranas mucocutâneas de animais e humanos (Dworkin, 2006). De acordo com a sua capacidade de coagular o plasma de coelho, as espécies são tradicionalmente divididas em dois grupos: coagulase positiva (CoPS) e coagulase negativa (CoNS) (Podkowik et al., 2013).

Staphylococcus lentus é um membro deste género coagulase-negativo, geralmente descrito como uma bactéria pertencente à flora normal da pele, do trato respiratório, trato gastrointestinal do homem, bem como do leite materno (Soeorg et al., 2017; Shaker et al., 2018). Apesar de ter influência benéfica nos processos de fermentação e nas características sensoriais dos produtos como carne e queijo, é uma **causa mundial de infeções humanas e animais**, incluindo casos de bacteremia, infeções de feridas, lesões piogénicas e mastites (Podkowik et al., 2013; Hay & Sherris, 2020), portanto, é normalmente considerada uma **espécie bacteriana patogénica oportunista**, uma vez que demonstra ter essa capacidade em pacientes imunocomprometidos, com doenças crónicas e pacientes de longa permanência em hospitais, pela sua capacidade de formar biofilmes e colonizar as superfícies dos dispositivos médicos (Becker et al., 2014; Al-Talib et al., 2020). Para além disso, outros fatores que

podem contribuir para a sua patogenicidade são as proteínas da sua parede celular, os polissacáridos exógenos, a produção de vários tipos de enzimas extracelulares (proteases, elastases, esterases, lipases e fosfolipases), várias toxinas, como famílias de hemolisinas, enterotoxinas, toxinas intestinais e inibidores do sistema imunológico (Michalik et al., 2020). As enterotoxinas (por ex. hemolisinas α , β , δ e γ , leucocidinas) produzidas por algumas estirpes desta espécie também já foram reconhecidas como agentes causadores de **intoxicações alimentares**, sendo capazes de interromper as respostas imunológicas humanas e animais (Podkowik et al., 2013).

Para a maioria dos recém-nascidos, o género *Staphylococcus* aparece durante a primeira semana de vida e persiste até à 8ª semana pós-parto. A abordagem semiquantitativa de um estudo realizado por Aujoulat et al. (2014), demonstrou que estes microrganismos dominam quantitativamente a microbiota intestinal até à terceira semana de vida; assim, a predominância de microrganismos CoNS pode ser considerada uma característica específica da microbiota intestinal de bebés extremamente prematuros (Aujoulat et al., 2014). Neste sentido, possuem igualmente um forte potencial para causar infeções da corrente sanguínea invasivas em recém-nascidos, especialmente naqueles nascidos prematuramente, uma vez que na unidade de terapia intensiva neonatal, são particularmente suscetíveis a adquirir **infeções nosocomiais**. Acredita-se que o processo que causa esse tipo de infeção esteja associado à translocação desses microrganismos do TGI para a corrente sanguínea (Adeghate et al., 2020).

Análises de bactérias dependentes e independentes de cultura revelaram que o colostro, o leite materno gerado 5 a 6 dias após o parto, é uma fonte de *Staphylococcus* spp. Os membros deste género são os microrganismos mais comuns **causadores de mastite**. A mastite lactacional está intimamente relacionada ao desequilíbrio bacteriano mamário no qual a microbiota responsável pela mastite aumenta enquanto a microbiota mamária normal diminui. Estas bactérias podem proliferar e produzir toxinas causando inflamação significativa nos tecidos mamários; as toxinas também podem ser rapidamente absorvidas e entrar, inclusive, no sangue. As mulheres que amamentam com mastite apresentam aumento

de citocinas pró-inflamatórias séricas, incluindo interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (Tao et al., 2020).

Atualmente, é conhecido que o **stress materno pré-natal**, durante a gravidez, é um fator de risco para distúrbios do neuro-desenvolvimento e gastrointestinais no feto, podendo afetar o metabolismo, fisiologia, cognição e comportamento. Num estudo realizado por Jašarević et al. (2018), *S. lentus* foi identificado como uma espécie bacteriana cuja abundância relativa ficou alterada pela exposição de ratos adultos ao stress, e **descrita por induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios do hospedeiro**, estando aumentada em todos os grupos de tratamento após a exposição ao stress crônico. O stress pré-natal, nesse artigo, foi associado a alterações no transcriptoma e ambiente intestinal fetal, bem como a alterações no intestino adulto (Jašarević et al., 2018).

Como observado anteriormente, o género *Staphylococcus* e, especificamente, a espécie *S. lentus* mostraram diferenças significativas a nível estatístico entre os grupos estudados, aumentando muito a sua abundância relativa nos ratinhos expostos à AFB1 e estando diminuído nas ninhadas controlo. Significa isto que, novamente, **com a introdução desta micotoxina na dieta materna, o feto pode sofrer alterações ao nível do microbioma intestinal** aumentando a quantidade destes microrganismos que, embora também possam fazer parte da microbiota normal e ter benefícios associados, a literatura bibliográfica sugere que têm igualmente capacidade patogénica oportunista, especialmente durante a gravidez, e após o parto, em bebés recém-nascidos prematuramente.

Para além disso, Abdelkader et al. (2020) investigaram a possível utilização de certas espécies bacterianas como agentes de controlo biológico contra o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em plantas de sorgo e amendoim, bem como a capacidade de biodegradação da AFB1. Observaram-se atividades antifúngicas máximas para *S. lentus* nas concentrações de 10 e 25 mL kg⁻¹, tendo capacidade de **impedir completamente o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* e de degradar completamente a AFB1 (96,54%)** em cultura líquida, impedindo o seu crescimento e desenvolvimento. Este foi o primeiro estudo a provar que *S. lentus* tem a capacidade de inibir o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* em 100% e degradar a AFB1 em 96% e, desse modo, pode ser usado para

controlar a acumulação dessa micotoxina em sementes de sorgo e amendoim pós-colheita (Abdelkader et al., 2020).

Por outro lado, curiosamente, estando presente de forma tão significativa nos ratinhos expostos à micotoxina, e sendo capaz de degradá-la eficazmente, pode conjecturar-se que *S. lentus* possa ter efeitos protetores e minimizar bastante os efeitos prejudiciais da AFB1 no intestino fetal. No entanto, o estudo referido anteriormente foi realizado somente em plantas, por isso, esta é apenas uma suposição; são, evidentemente, necessários estudos que comprovem esta interessante capacidade de degradação do *S. lentus* em humanos.

Também o género bacteriano *Dorea*, composto por bacilos Gram-positivos anaeróbios estritos, e particularmente a espécie *D. longicatena*, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as ninhadas controlo e tratadas com a aflatoxina, sendo maioritária nestas últimas (e com valores semelhantes entre machos e fêmeas), diminuindo nas ninhadas controlo. Esta é uma espécie dominante no intestino humano em contagens de células de aproximadamente 10^9 g^{-1} (peso seco) nas fezes, que não produz butirato, mas que tem capacidade de fermentar a glicose e outros açúcares, cujos principais produtos finais do metabolismo são etanol, formato, acetato, hidrogénio e dióxido de carbono que podem ser utilizados por outros microrganismos (Taras et al., 2002; Cecchini et al., 2013).

Tem sido objeto de estudo principalmente em relação à **doença de Crohn** - doença inflamatória crónica do intestino - encontrada de forma aumentada na mucosa do íleo terminal de indivíduos que sofrem de recorrência pós-operatória dessa patologia (Mondot et al., 2016). Isto é explicado principalmente pelo facto deste microrganismo ter capacidade de metabolizar ácidos siálicos, que são comumente encontrados nas extremidades terminais das mucinas, e cuja libertação está associada à degradação da mucina, **aumentando potencialmente a permeabilidade intestinal** (Schirmer et al., 2016).

Também o cancro colorretal (CCR) é uma doença grave - a terceira forma mais comum de cancro - e representa uma ameaça crítica à saúde pública. Yang et al. (2019) procuraram elucidar a conexão entre a microbiota intestinal, dieta e CCR através da análise metagenómica de bactérias isoladas das fezes de indivíduos doentes e saudáveis. O género *Dorea* foi descrito como sendo mais abundante em amostras fecais de pacientes com CCR

do que nas amostras controle saudáveis; estas bactérias têm a **capacidade de aderir às células cancerígenas**, o que pode conferir-lhes uma vantagem competitiva no ambiente colorretal neoplásico. Por isso, estes autores destacam a **capacidade oportunista** deste gênero bacteriano e o seu potencial **papel carcinogénico** (J. Yang et al., 2019).

Para além disso, *D. longicatena* também se encontra associada à permeabilidade intestinal em pacientes que sofrem de SII, uma patologia caracterizada por inflamação das vilosidades intestinais; isso acontece porque este microrganismo se alimenta de fibras pré-bióticas, nomeadamente a inulina e os fruto-oligossacáridos (FOS), e dessa forma, reduz os efeitos benéficos para o hospedeiro que essas fibras podem ter (facilitar a defecação e reduzir a endotoxemia, resistência à insulina e riscos de cancro do cólon), aproveitando-se do consumo dessas fibras pelo paciente, para proliferar. O *locus* de utilização de FOS da *Dorea* é duas vezes mais abundante nos microbiomas de pacientes que sofrem de SII do que nos de indivíduos saudáveis. Constatou-se que o transportador de FOS, que esta espécie utiliza, é específico para a *kestose* (trissacárido precursor da inulina), seja para ligação, transporte ou fosforilação. Este sistema de utilização de FOS por *D. longicatena* é a primeira via de metabolização pré-biótica a ser caracterizada a partir de uma **bactéria intestinal humana não benéfica** (Z. Wang et al., 2020).

Segundo Schirmer et al. (2016) esta espécie bacteriana foi também associada à atividade de citocinas e a níveis elevados de IFN- γ em resposta a estímulos derivados de fungos, como *Candida albicans* (Schirmer et al., 2016).

No entanto, deve ter-se em conta que nem sempre é prejudicial que esta bactéria esteja aumentada, uma vez que ela é um biomarcador potencial que pode estabelecer a ligação entre a microbiota intestinal e o estado metabólico de algumas patologias. Por exemplo, sabe-se que produz um ácido gordo de cadeia curta como produto da fermentação, o acetato; este pode ser utilizado por outros microrganismos para gerar butirato. Recordando o que foi dito anteriormente, o butirato tem diversos efeitos benéficos no hospedeiro, nomeadamente servir de fonte de energia para os enterócitos, contribuir para a regulação da integridade da barreira epitelial e para a redução da inflamação extra e intrainestinal. Assim, claramente que proporções diminuídas de bactérias produtoras de butirato no intestino têm sido associadas a

vários distúrbios intestinais, como doenças inflamatórias intestinais, obesidade, diabetes *mellitus* e hipertensão (Kamo et al., 2017). Assim, curiosamente neste caso, pode presumir-se que a redução daquele microrganismo possa limitar a disponibilidade de acetato, e conseqüentemente, de butirato, **desregulando a função de barreira intestinal**, bem como outros mecanismos adjacentes que prejudicam significativamente o paciente (Mamic et al., 2021). A diminuição da *D. longicatena* pode contribuir, em parte, para o sobrecrescimento concomitante de microrganismos patogênicos intestinais, o desenvolvimento de sintomas gastrointestinais e, possivelmente, até mesmo a fibrose.

Tendo em conta que esta espécie bacteriana está muito reduzida nas ninhas controle, aumentando de forma considerável após a exposição à AFB1, e posto tudo o que foi referido, na generalidade, as evidências bibliográficas parecem sugerir que a abundância deste microrganismo está **“negativamente associada à manutenção de um intestino saudável”** (Mortaş et al., 2020), constituindo mais uma evidência de que pode surgir **disbiose intestinal como consequência da exposição precoce à AFB1, uma vez que esta demonstra promover o aumento de espécies com potencialidade patogénica e inflamatória.** Neste caso, uma superabundância desta espécie na microbiota fetal, é possível que possa contribuir para uma probabilidade mais elevada do aparecimento (ou agravamento) de patologias graves, como a doença de Chron, SII e CCR.

Relativamente a um potencial efeito probiótico desta espécie bacteriana, a sua relação com o metabolismo de um hospedeiro saudável ainda não foi descrita anteriormente, e não há características reconhecíveis deste microrganismo que possam explicar essa associação; quaisquer efeitos benéficos que possa ter, ainda permanece uma questão em aberto (Brahe et al., 2015). Todavia, Hsiao et al. (2014) estudaram uma comunidade artificial de 14 espécies de bactérias intestinais humanas sequenciadas, que se correlacionaram diretamente com a recuperação e maturação da microbiota intestinal infantil da cólera, onde estava incluída *D. longicatena*. Quando analisaram os níveis de *Vibrio cholerae* nas fezes de ratos colonizados com essa bactéria, observou-se que os níveis de *D. longicatena* diminuíram significativamente após a invasão daquela espécie bacteriana. Assim, esta espécie, em conjunto com outras que foram identificadas, pode contribuir para controlar a colonização e

a virulência por este vibrio, o que sugere um eventual efeito benéfico para o hospedeiro (Hsiao et al., 2014).

Parabacteroides distasonis também foi uma espécie bacteriana que colonizou o ambiente intestinal de forma distinta entre as ninhadas expostas à AFB1 e as ninhadas controle, sendo significativamente reduzido após a exposição ao contaminante alimentar. Esta bactéria Gram-negativa **produz um número muito elevado de glicanos** fucosilados, comparando com as outras espécies do mesmo género bacteriano, e é normalmente considerado um microrganismo inofensivo na microbiota intestinal (Comstock, 2009).

Kverka et al. (2011) demonstraram que *P. distasonis* **reduz significativamente a severidade da inflamação intestinal em modelos de ratinhos** com colite aguda e crónica experimental (induzida por sulfato de sódio dextrano, DSS), evitando o aumento de várias citocinas pró-inflamatórias (como o TNF- α), aumentando anticorpos séricos específicos e estabelecendo a ecologia microbiana intestinal. Os autores observaram que, após administração oral de uma fração da membrana deste microrganismo em ratos BALB/c, ocorreu uma alteração na produção local de citocinas no intestino, resultando num meio anti-inflamatório inespecífico, estimulação de mecanismos imunes adaptativos e estabilização da composição da microbiota intestinal, tornando os ratos menos suscetíveis à colite. As alterações provocadas por esta espécie bacteriana foram observadas nas placas de Peyer, ceco e cólon dos animais em comparação com os controlos, sugerindo efeitos locais em todo o intestino. A atividade imunomoduladora deste microrganismo pode interferir com a acumulação de leucócitos na mucosa intestinal e com o comprometimento da função de barreira e **contribuir para diminuir a inflamação**. Os resultados sugerem que, componentes bacterianos específicos derivados deste comensal, podem ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças inflamatórias crónicas, como DII (Kverka et al., 2011).

Cuffaro et al. (2020) apoiaram estes resultados através de um outro estudo *in vitro*, em ratos BALB/C ByJ adultos e recém-nascidos, com colite aguda experimental induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfónico (TNBS), onde foi destacado um forte potencial benéfico de *P. distasonis* na saúde, pois duas estirpes deste microrganismo (PF-BaE7 e AS23) exibiram um

forte **potencial anti-inflamatório** e outras três estirpes (PF-BaE5, PF-BaE11 e AS93) **restauraram, de forma significativa, a barreira epitelial intestinal**. Além disso, demonstraram que estas estirpes também ativavam células dendríticas para induzir linfócitos T reguladores e induziam a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, que é conhecida pela sua capacidade de atenuar as respostas pró-inflamatórias Th1 e Th17, principalmente pela redução da produção de IL-12 e IL-23. Também, curiosamente, os ratos tratados com esta espécie bacteriana exibiram níveis mais baixos de claudina-2, um componente estrutural do complexo das TJ, formadora de poros, que é reconhecida como um mediador do "intestino permeável", aumentando a passagem de macromoléculas através da barreira epitelial, que, normalmente, está elevada em pacientes com DIIs. As estirpes PF-BaE5 e PF-BaE11 (testadas em amostras fecais de recém-nascidos) foram as que apresentaram os melhores efeitos anti-inflamatórios, e, embora a sua total capacidade de colonização e inocuidade ainda não tenham sido confirmadas, as observações deste estudo sugerem uma **potencial utilização dessas bactérias em intervenções terapêuticas perinatais** (Cuffaro et al., 2020).

No entanto, dentro do mesmo assunto, os resultados de um estudo realizado por Dziarski et al. (2016) são controversos relativamente aos anteriores, pois descrevem *P. distasonis* como **uma espécie promotora de colite** (induzida por DSS) em ratinhos BALB/c, e indicam que o seu aumento na microbiota intestinal é parcialmente responsável pelo aumento da sensibilidade dos animais a essa inflamação intestinal. Estes autores descrevem alterações nas proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (Pglyrps), moléculas incluídas na imunidade inata, antibacterianas, que participam na manutenção da microbiota intestinal e modulam as respostas inflamatórias. Os animais deficientes em qualquer um dos quatro genes Pglyrp são mais sensíveis à colite. *P. distasonis* foi considerado uma espécie promotora de colite nos ratinhos, evidenciada principalmente por: **(i)** perda significativa e acelerada de peso corporal; **(ii)** aumento do sangramento intestinal; **(iii)** hiperplasia significativamente mais pronunciada da lâmina própria; **(iv)** perda de criptas, infiltração com células inflamatórias, perda de epitélio, perda de células caliciformes e ulceração (Dziarski et al., 2016).

Esses resultados discrepantes, entre o estudo de Dziarski et al. (2016) e o estudo de Cuffaro et al. (2020), podem ser devidos a diferenças entre modelos animais, pacientes e diferentes fontes de amostras, já que uns ensaios foram realizados em fezes (e representam bactérias fecais), enquanto que outros representam bactérias associadas a tecidos de segmentos proximais do intestino, cólon e íleo, que frequentemente mostram mudanças opostas na abundância e nos tipos de bactérias (Dziarski et al., 2016).

Wang et al. (2019) demonstraram os **benefícios metabólicos** de *P. distasonis* na redução do ganho de peso, hiperglicemia e esteatose hepática em ratos obesos e alimentados com uma dieta lipídica. O tratamento com esta espécie alterou dramaticamente o perfil de ácidos biliares - tendo capacidade de converter ácidos biliares primários em secundários - e **aumentou o nível de succinato intestinal**, que foi recentemente confirmado como um ácido dicarboxílico importante na manutenção da homeostase da glicose (K. Wang et al., 2019). O succinato produzido por este microrganismo, não só é precursor da glicose na gliconeogênese intestinal, mas também aumenta a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase para melhorar a homeostase da glicose. Os resultados descrevem este comensal intestinal como “um **probiótico promissor** que pode modular o metabolismo do hospedeiro para atenuar disfunções metabólicas” (K. Wang et al., 2019).

Para além disso, Koh et al. (2020) demonstraram que esta espécie bacteriana **atenua a tumorigênese, modula marcadores inflamatórios e promove a integridade da barreira intestinal** de ratos com 6 semanas de idade, principalmente através da elevação da proteína zónula *occludens-1* (ZO-1) nas *tight junctions*. Os autores demonstraram que a administração desta espécie bacteriana nestes animais pode reduzir a incidência do tumor do cólon quando administrado antes ou depois do desenvolvimento do mesmo; *P. distasonis* provocou o aumento precoce da IL-10 e do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), um aumento significativo da proteína ZO-1 e uma redução da ativação do *Toll-like receptor 4* (TLR4) (Koh et al., 2020). Noutro estudo dos mesmos autores, *P. distasonis* demonstrou ter **propriedades anti-inflamatórias e anti-neoplásicas** que são provavelmente mediadas pela supressão - de forma dose-dependente - da libertação de citocinas inflamatórias de linhas de células do cancro do colón, bem como da sinalização do TLR4, proteína cinase B (Akt) e

promoção da apoptose. A atividade reduzida dessas vias pró-tumorigênicas, e a indução da apoptose, podem mesmo constituir um mecanismo que inibe (ou minimiza) a formação do tumor observado nesses ratos. Assim, os resultados destes estudos sugerem que a administração deste microrganismo pode ter utilidade na **prevenção da tumorigênese colorretal** em populações de risco (Koh et al., 2018).

De acordo com a literatura bibliográfica descrita anteriormente, compreende-se que *P. distasonis*, na generalidade, tem numerosas funções benéficas e protetoras para a mucosa intestinal dos ratinhos, podendo ser crucial na homeostase do intestino infantil. No entanto, nos resultados obtidos do presente estudo, verifica-se que **a exposição materna à AFB1 provocou uma diminuição acentuada da abundância relativa de *P. distasonis* nos ratinhos descendentes**, com diferenças bastante significativas, comparativamente aos controlos. Isto significa que esta micotoxina provocou a redução de bactérias do microbioma benéfico, podendo eventualmente provocar disbiose e comprometimento da função de barreira intestinal nos ratinhos.

A abundância relativa de *Faecalibaculum rodentium*, uma espécie bacteriana Gram-positiva, variou de forma significativa entre as ninhadas controlo e tratadas e é considerado um microrganismo interessante a nível intestinal, uma vez que apresenta maior capacidade de fermentação - especialmente na **produção de butirato** - do que outros microrganismos, e é descrito como o principal substituto de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. à medida que o intestino se torna estritamente anaeróbio com a idade, principalmente quando ocorre a mudança do metabolismo do lactato para o aumento da produção de SCFAs e de hidratos de carbono complexos (S. Lim et al., 2016). Este anaeróbio estrito já foi negativamente correlacionado com os parâmetros da síndrome metabólica do hospedeiro, possivelmente sugerindo o **papel importante dessa espécie na atenuação de distúrbios metabólicos** causados por dietas ricas em lípidos, e indicando o seu potencial papel como **probiótico**. Os grupos de proteínas produzidos por este microrganismo já foram encontrados em muitas vias importantes, incluindo o metabolismo de butanoato e propanoato, ribossomas, enzimas relacionadas a aminoácidos e proteínas de reparação e recombinação de DNA, o que sugere

que esta espécie bacteriana pode ter um papel importante na regulação dessas vias metabólicas (Ke et al., 2019).

Zagato et al. (2020) demonstraram que esta espécie induziu uma redução do tamanho do tumor no CCR, diminuição da proliferação das células tumorais e do sangramento retal, duas semanas após a administração em ratos C57BL/6, com 8 semanas de idade. Estes resultados sugerem que *F. rodentium*, individualmente, ou em cooperação com outras bactérias, **afeta a proliferação das células tumorais** e a acetilação de proteínas, provavelmente através da liberação local de SCFAs (propionato, butirato e acetato) e da redução da ativação da calcineurina. Estes SCFAs, através da modulação da atividade inibitória da histona deacetilase, promovem a acumulação e a diferenciação das células Treg, controlando a progressão tumoral (Zagato et al., 2020). Observou-se também uma redução do lactato nas fezes dos ratos tratados com esta espécie; como este composto é conhecido por ser produzido e usado por células tumorais, a redução do lactato após a administração de *F. rodentium*, pode ser devido à redução da proliferação das células tumorais provocadas por este, o que faz com que **esta espécie bacteriana seja considerada antineoplásica**, com forte potencial diagnóstico e terapêutico (Zagato et al., 2020).

Os resultados deste trabalho referentes a esta espécie bacteriana revelam uma abundância relativa muito elevada nos ratinhos descendentes controle, que é significativamente reduzida com a exposição materna à AFB1. Portanto, sugere-se que **esta micotoxina**, ao provocar uma redução do *F. rodentium*, **está a diminuir a colonização de espécies bacterianas produtoras de butirato**, e com funções protetoras importantes a nível intestinal, que são cruciais ao normal funcionamento do intestino, ainda em desenvolvimento, destes ratinhos.

Para além da importância dos índices de diversidade, também dentro de uma população em estudo, a identificação de padrões de abundância microbiana fornece uma base a partir da qual se pode construir uma maior compreensão dos processos ecológicos e evolutivos que atuam nos sistemas microrganismo-hospedeiro, e pode fornecer candidatos potenciais para uma investigação aprofundada no que diz respeito à ecologia e função desse microrganismo. Embora os microrganismos comuns e mais conhecidos que habitam a nossa microbiota

intestinal possam ter um papel funcional ou adaptativo, muitos microrganismos raros são essenciais e desempenham funções relevantes no hospedeiro. Por este motivo, e porque neste estudo em particular, é importante identificar espécies bacterianas que possam, de facto, ter influência no microbioma, **foi determinado o core microbiome** ou microbioma central. Normalmente, na literatura, este é descrito como “um grupo de microrganismos que são particularmente notáveis ou importantes no microbioma por estarem de alguma forma associados ao hospedeiro, quer seja pela sua distribuição espacial, estabilidade, influência ecológica ou contribuição para a função e aptidão do hospedeiro” (Risely, 2020).

Os resultados desta análise descrita anteriormente encontram-se na Figura 24 para o género e na Tabela 12 para as espécies e géneros bacterianos, presentes exclusivamente nas ninhadas controlo ou tratadas com a aflatoxina.

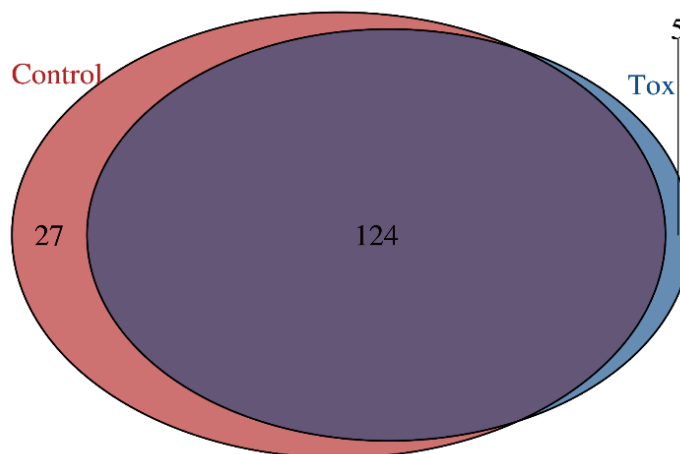


Figura 24: Core microbiome para o Género

Tabela 12: Géneros e espécies resultantes da análise core microbiome

Géneros		Espécies	
Controlos	Toxinogénicos	Controlos	Toxinogénicos
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Oceanisphaera</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Vibrio toranzoniae</i>
<i>Sporobacter</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Sporobacter termitidis</i>	<i>Vibrio gallaecicus</i>
<i>Sphingopyxis</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Unidentified eubacterium</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Spartobacteria</i>	<i>Bilophila</i>	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	<i>Psychrilyobacter atlanticus</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Pseudomonas protegens</i>	<i>Porphyromonas pasteri</i>
<i>Pseudonocardia</i>		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Paraferrimonas sedimenticola</i>
<i>Peptoniphilus</i>		<i>Prevotella fusca</i>	<i>Oceanisphaera donghaensis</i>
<i>Peptococcus</i>		<i>Marseilla massiliensis</i>	<i>Gordonia defluvii</i>
<i>Nubsella</i>		<i>Peptococcus niger</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>
<i>Massilia</i>		<i>Massilia niastensis</i>	<i>Clostridium populeti</i>
<i>Insolitispirillum</i>		<i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i>	<i>Clostridium vincentii</i>
<i>Gp1</i>		<i>Eubacterium pyruvativorans</i>	<i>Bilophila wadsworthia</i>
<i>Gp6</i>		<i>Emergencia timonensis</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>Gp4</i>		<i>Breznakia pachnodae</i>	<i>Bacteroides finegoldii</i>
<i>Gp16</i>		<i>Enterobacter tabaci</i>	<i>Mordavella massiliensis</i>
<i>Enterococcus</i>		<i>Raoultibacter massiliensis</i>	
<i>Enterobacter</i>		<i>Desulfovibrio litoralis</i>	
<i>Dethiosulfovibrio</i>		<i>Longibaculum muris</i>	
<i>Coprobacillus</i>		<i>Clostridium celerecrescens</i>	
<i>Clostridium XI</i>		<i>Clostridium ghonii</i>	

(Continua na página seguinte)

Tabela 12 - Gêneros e espécies resultantes da análise core microbiome (continuação)

Gêneros – Controlos	Espécies - Controlos
<i>Catabacter</i>	<i>Clostridium sartagoforme</i>
<i>Brevundimonas</i>	<i>Clostridium sufflavum</i>
<i>Brassicibacter</i>	<i>Catabacter hongkongensis</i>
<i>Aridibacter</i>	<i>Intestinibacillus massiliensis</i>
<i>Anaerosphaera</i>	<i>Brassicibacter mesophilus</i>
<i>Allobaculum</i>	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Anaerostipes caccae</i>
	<i>Anaerofilum pentosovorans</i>
	<i>Fenollaria massiliensis</i>
	<i>Allobaculum stercoricanis</i>

Através da observação da figura e tabela anteriores verifica-se que existem 27 e 5 géneros que estão presentes somente nas ninhadas controlo e nas ninhadas expostas à aflatoxina, respetivamente; no que diz respeito às espécies, 34 encontram-se somente nos controlos e 15 estão presentes apenas no microbioma dos ratinhos cuja progenitora foi exposta ao contaminante. Esta análise e comparação é importante, uma vez que permite compreender quais espécies aparecem no microbioma efetivamente por causa da exposição materna à micotoxina, e dessa forma, perceber que funções e que consequências é que esses microrganismos podem ter no intestino dos ratinhos descendentes.

Analisando, em primeiro lugar, as espécies presentes **apenas nas ninhadas que sofreram exposição materna à AFB1**, destacam-se duas principais espécies bacterianas que são ubíquas na mucosa intestinal humana, *Bilophila wadsworthia* e *Desulfovibrio piger*, pertencentes ao grupo das **bactérias redutoras de sulfato (SRBs)**, isto é, bactérias consideradas sulfidogénicas intestinais (Kasten et al., 1992; Loubinoux et al., 2002). Estas bactérias, presentes geralmente em quantidades que variam de 10^3 a 10^{11} /g nas fezes humanas, são de grande importância funcional e numérica em muitos ecossistemas e podem

crescer sob diferentes condições físico-químicas. Curiosamente, são os únicos microrganismos nos ecossistemas intestinais que dependem do sulfato inorgânico para a conservação de energia, de modo a realizar a **redução dissimilatória do sulfato** (Kushkevych et al., 2019). Este processo consiste em reações catalíticas sequenciais em que, resumidamente, ocorre ativação do sulfato por uma ATP sulfurilase, posterior redução a sulfito e, de seguida, redução em **sulfureto de hidrogénio** (H₂S) pela sulfito redutase dissimilatória (Barton et al., 2014). Portanto, estes microrganismos utilizam o sulfato como aceitador final de eletrões para a respiração, com a produção concomitante de H₂S, considerado o composto sulfatado mais suspeito na etiologia de distúrbios do cólon e inflamação. Embora os colonócitos sejam capazes de metabolizar o H₂S, em determinadas concentrações, este produto do metabolismo do sulfato tem diversos **efeitos prejudiciais à saúde intestinal**, nomeadamente: **(i)** inibição da oxidação do butirato, que é a principal fonte de energia dos colonócitos intestinais de humanos e animais; **(ii)** inibição da motilidade espontânea do cólon humano e murino, bem como promoção da ulceração intestinal em ratos; **(iii)** inibição da citocromo c oxidase, a oxidase terminal da cadeia de transporte de eletrões mitocondrial e, portanto, pode ocorrer inibição do consumo de oxigénio mitocondrial; **(iv)** capacidade de atravessar as membranas biológicas, devido à sua lipossolubilidade; **(v)** aumento da permeabilidade da barreira epitelial das células da mucosa; **(vi)** fagocitose, morte de bactérias intestinais, hiperproliferação e anomalias metabólicas das células epiteliais (Kushkevych et al., 2019). Além disso, é citotóxico, mutagénico e cancerígeno, portanto, Blachier et al. (2010) sugerem que “qualquer desequilíbrio entre a concentração de sulfureto livre na mucosa intestinal e a capacidade de metabolização das células epiteliais resultará na perda da capacidade oxidativa normal dessas células, e talvez no processo da sua renovação normal, com possíveis consequências no processo de inflamação da mucosa”, uma característica das doenças inflamatórias intestinais (Blachier et al., 2010; Kushkevych et al., 2018).

Por ter sido inicialmente isolada de pacientes com apendicite e outras doenças inflamatórias intestinais, onde foi descrita por induzir genotoxicidade e mecanismos pró-inflamatórios, o habitat natural da *B. wadsworthia* foi considerado o trato gastrointestinal

inferior. É uma **espécie virulenta**, associada a casos de abscessos, bacteremias e, principalmente apendicites em crianças e adultos; para além disso, a sua associação com outros microrganismos patogénicos anaeróbios conhecidos, e a sua recuperação de outros processos infecciosos, são sugestivos das propriedades patogénicas desta espécie (Summanen et al., 1995; Schumacher et al., 1997). Já demonstrou igualmente possuir **capacidade de aderência às células intestinais embrionárias humanas** em cultura; no entanto, ainda se conhece pouco a cerca dos seus mecanismos de fixação a essas células, embora já tenha sido comprovada a presença de proteínas de membrana externa reguladas por ferro, que podem ter um potencial papel na virulência desta bactéria (Baron, 1997; Gerardo et al., 1998). A presença de genes envolvidos na fosforilação oxidativa (citocromo oxidases bd) nos genomas da *B. wadsworthia* indica a sua competência para habitar locais onde a percentagem de oxigénio é muito baixa, como a interface epitelial. Esta bactéria contém genes que codificam para a monóxido de carbono desidrogenase (CODH), prevendo a sua capacidade de usar monóxido de carbono (CO) como doador de eletrões. A heme oxigenase é uma fonte conhecida de CO intestinal e foi demonstrado que a sua atividade é regulada positivamente durante a **inflamação intestinal**; isso sugere que a utilização de CO por esta espécie seja mais um mecanismo de patogenicidade. Por outro lado, também possui um conjunto de genes que permite a respiração anaeróbia de nitrato, um substrato que é igualmente enriquecido durante processos inflamatórios (Veiga et al., 2014).

B. wadsworthia é o único comensal intestinal caracterizado até ao momento com capacidade de adquirir energia através da respiração de sulfito, em vez da respiração direta de sulfato. Isto porque **realiza um tipo único de respiração anaeróbia** em que a taurina, um importante e abundante soluto orgânico em mamíferos, é usada como fonte de sulfito que serve como aceitador final para a cadeia transportadora de eletrões (S. Silva et al., 2008). Após uma degradação inicial da taurina através da taurina:piruvato aminotransferase, as duas primeiras reações enzimáticas resultam na produção de sulfito, e este é subsequentemente convertido em H₂S por uma sulfito redutase dissimilatória diferente das outras SRBs (Carbonero et al., 2012). Como a taurina está presente em elevadas concentrações nos tecidos dos mamíferos (2–20 mM), esta via também pode ser importante para a patogénese desta

espécie, dada a genotoxicidade e citotoxicidade do H₂S nas células epiteliais intestinais (Peck et al., 2019).

Tem sido descrito igualmente que este microrganismo pode utilizar vários produtos resultantes de processos fermentativos, como formato, lactato, piruvato e, principalmente, hidrogénio, produzido por fermentações colónicas. Considerando que *B. wadsworthia* vive no cólon humano, um ambiente rico em hidrogénio, Silva et al. (2008) investigaram a possibilidade de que esse composto também sirva como fonte de energia eficiente para essa bactéria. Os resultados desse estudo sugerem que *B. wadsworthia* pode expressar até cinco hidrogenases diferentes que são expressas em todas as condições de crescimento, revelando a importância do hidrogénio no seu metabolismo e crescimento, podendo assim constituir igualmente um fator de virulência (S. Silva et al., 2008).

Devkota et al. (2012) relataram que uma dieta rica em gordura saturada, derivada do leite, induziu um crescimento de *B. wadsworthia* no intestino de ratos que carecem da IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Isto acontece porque a dieta com gorduras saturadas do leite leva ao aumento da conjugação da taurina hepática com os ácidos biliares, fornecendo mais ácido taurocólico rico em enxofre no intestino, o que acelera o crescimento da bactéria (Devkota et al., 2012; Devkota & Chang, 2015). De facto, as vias génicas que são significativamente moduladas pela presença deste patobionte são aquelas envolvidas no metabolismo dos ácidos biliares, cada vez mais reconhecidos como importantes fatores de sinalização e regulação do metabolismo, sendo sintetizados a partir do colesterol. O impacto da *B. wadsworthia* nesta via metabólica pode ser um mecanismo pelo qual a bactéria potencializa o comprometimento metabólico e disfunções do hospedeiro, particularmente **inflamação e disfunção da barreira intestinal** (Natividad et al., 2018).

Para além disso, Zhou Feng et al. (2017) demonstraram que *B. wadsworthia* pode induzir respostas patológicas em ratos *germ-free*, por exemplo, o **aumento da resposta inflamatória sistémica**; as principais citocinas inflamatórias circulantes, como proteínas séricas amilóides A (SAA) e a interleucina-6 (IL-6), aumentaram significativamente após a inoculação com esta espécie (Z. Feng et al., 2017). As proteínas SAA são proteínas de fase aguda segregadas principalmente pelo fígado em resposta a estímulos pró-inflamatórios, e os

seus níveis aumentados no soro já foram associados a várias doenças inflamatórias crônicas, como obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina e doenças cardiovasculares. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e reguladora da resposta imune, produzida por uma variedade de células imunes e macrófagos; a sua sinalização é fundamental na desregulação do processo inflamatório intestinal, conduzindo diretamente à proliferação e diferenciação de linfócitos, induzindo respostas imunes às células afetadas e respostas humorais da mucosa dirigidas contra a reinfeção. O que acontece é que a elevada produção de IL-6 (pelos macrófagos intestinais e pelas células T CD4⁺), bem como do seu recetor sIL-6R provocada pela *B. wadsworthia*, conduz ao aumento da expressão e à translocação nuclear do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), que induz proteínas anti-apoptóticas. De seguida, ocorre um aumento da resistência das células T da lâmina própria à apoptose e, conseqüentemente, o aumento das células T contribui para a perpetuação da inflamação crônica intestinal. Assim, o aumento dos níveis séricos de IL-6 provocado pela bactéria, fornece a base para uma maior **proliferação inflamatória crônica**. O facto da *B. wadsworthia* poder promover inflamação sistémica pode ser responsável pela sua elevada prevalência nas fezes de ratos com doenças crônicas, como o cancro do cólon, colite, diabetes e obesidade (Mudter & Neurath, 2007; Waldner & Neurath, 2014; Z. Feng et al., 2017; Y. Guo et al., 2020).

Por outro lado, esta bactéria foi também superiormente detetada na microbiota colónica de pacientes com CCR, o que significa que tem **capacidade de se ligar a células epiteliais humanas do cólon**, que é geralmente considerado o primeiro passo para estabelecer a infecção no hospedeiro; assim, confirma-se também o seu **possível papel na carcinogénese colorretal** (Z. Feng et al., 2017). Para além disso, como já referido, a produção de H₂S, conduzida por esta bactéria sulfidogénica, inibe a β-oxidação dos SCFAs pelos colonócitos, privando-os de energia e comprometendo a função de barreira (Dolan & Chang, 2017; Dahmus et al., 2018).

Relativamente ao *Desulfovibrio piger*, constitui 67-91% do número total de SRBs intestinais, podendo ser mais patogénica que todas as outras (Kushkevych, 2014). Pensa-se estar associado a várias condições clínicas, como DII, mas até agora existem poucos estudos que o descrevam a partir de amostras fecais humanas (Chen et al., 2019).

Amirkhanzadeh et al. (2020) sugeriram que esta espécie bacteriana contém LPS na sua membrana celular externa que vão interagir com macrófagos e estimular a resposta imune por libertação de citocinas pró-inflamatórias; são descritos níveis aumentados de IL-1 β e IL-6, e níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-4 e IL-10, sendo que esta última controla as respostas imunes patogénicas e inflamatórias no intestino e é crítica para a regulação epitelial do cólon, bem como para a manutenção da integridade da barreira intestinal (Asseman et al., 1999; Amirkhanzadeh et al., 2020).

Os fatores-chave na virulência do *D. piger* são, sem dúvida, os LPS e a sua capacidade de redução do sulfato, em que utiliza H₂, lactato e ácido fórmico como doadores de eletrões (Ran et al., 2019). Num estudo realizado por Rey et al. (2013), a análise de sequenciação do RNA das células de cólons proximais de ratos revelou que a colonização por *D. piger* está associada a **níveis significativamente mais baixos de mRNAs que codificam para as várias subclasses de imunoglobulinas e proteínas das TJ** (claudina-4) cuja alteração da homeostase contribui para a desregulação da função de barreira epitelial; além de níveis mais elevados de metaloproteinases-7, que promovem a degradação da matriz extracelular (Rey et al., 2013). Para além disso, Loubinoux et al. (2002) demonstraram que os números de SRBs e a taxa de sulfidogénese eram superiores em pacientes com colite ulcerativa em comparação com os controlos; comparando os pacientes com DII a indivíduos saudáveis ou pacientes com outros sintomas gastrointestinais, **a prevalência do *D. piger* nas fezes, detetada por PCR, foi significativamente maior nos pacientes com DII**; isso pode acontecer, ou porque *D. piger* possui características fisiológicas que causam o aparecimento de lesões e/ou participam na perpetuação de processos inflamatórios crónicos ou porque a colonização por esta espécie é favorecida por condições locais em pacientes com DII (Loubinoux et al., 2002). No entanto, são necessários mais estudos para se compreender de que forma este microrganismo está implicado neste tipo de patologias.

Curiosamente, Groot et al. (2021), quando investigaram os efeitos mediados pela microbiota em pacientes com diabetes tipo I, propôs-se que *D. piger* se correlacionou positivamente com os níveis plasmáticos de 1-araquidonoil-GPC (A-GPC), um dos metabolitos-chave que também se associou com a produção mais eficiente de péptido C, o péptido que é obtido

quando a pró-insulina é degradada em insulina. Por outro lado, *D. piger* e este metabolito correlacionam-se negativamente com as células T CD4⁺CXCR3⁺ e CD8⁺CXCR3⁺. Portanto, este microrganismo foi considerado nesse estudo como um forte candidato para **diminuir a imunidade**, afetando as células mencionadas anteriormente, através da produção de A-GPC, por exemplo, pela absorção por dendritos protuberantes de **células imunes no lúmen intestinal** (Groot et al., 2021).

Tendo em conta que estas duas espécies redutoras de sulfato descritas anteriormente estão presentes no microbioma dos ratinhos-filho exclusivamente após a exposição das progenitoras à AFB1, significa que **esta micotoxina promoveu o desenvolvimento e proliferação destes microrganismos patogénicos intestinais nos descendentes**, comprometendo o normal funcionamento do intestino e, muito provavelmente, podendo contribuir para o aparecimento de várias repercussões mais tarde na vida, devido a essa exposição. O principal contributo destas espécies para a **potencialidade inflamatória intestinal prende-se na inibição da oxidação do butirato**, essencial para a saúde dos colonócitos. O butirato é produzido durante a fermentação do cólon e oxidado pelos colonócitos através do enzima acil-CoA desidrogenase; como este enzima é inibido pelo H₂S, a oxidação do butirato é comprometida por este composto. Uma vez que os processos de absorção de iões, síntese de mucina, síntese de lípidos de membrana e desintoxicação dos colonócitos dependem da oxidação do butirato, é de esperar que, diminuições da oxidação desse SFCA, com o aumento das SRBs provocado pela AFB1, comprometam a função de barreira epitelial. Não se sabe ainda se as SRBs do cólon possuem a capacidade de mudar de estilos de vida sulfidogénicos para não sulfidogénicos no cólon, mas a capacidade de se adaptar a níveis variáveis de sulfato já lhes confere uma vantagem competitiva (Carbonero et al., 2012).

Bacteroides thetaiotaomicron é um organismo comensal encontrado em grande parte em humanos, colonizador da microbiota infantil logo um dia após o nascimento, e habita essencialmente o cólon humano, sendo conhecido por se adaptar às mudanças nos nutrientes disponíveis e por contribuir fortemente para o metabolismo dos hidratos de carbono (Zocco et al., 2007; Wegorzewska et al., 2019); utiliza um grande conjunto de enzimas e

transportadores para degradar e utilizar uma variedade de glicanos complexos, incluindo os que são sintetizados pelo hospedeiro e os polissacáridos da dieta, resistentes à degradação mediada pelo hospedeiro, por exemplo sulfato de condroitina, mucina, hialuronato e heparina que estão presentes nos enterócitos (D'Elia & Salyers, 1996). A capacidade desta bactéria utilizar glicanos da mucosa relativamente estáveis e cobiçados no intestino neonatal deve ajudá-la a resistir neste ecossistema para que possa, mais tarde, tornar-se um membro dominante da comunidade microbiana adulta, à medida que os polissacáridos dietéticos são introduzidos (Bjursell et al., 2006).

Para além da utilização de polissacáridos, este simbiote também tem **capacidade de segregar uma série de aminoácidos** em elevadas concentrações, nomeadamente, histidina, cisteína e glicina. Apesar de serem importantes ao nível da nutrição, os aminoácidos também têm uma vasta gama de funções no metabolismo epitelial do intestino e na função imunológica/neurológica intestinal. Aqueles produzidos por esta espécie são importantes para a síntese de ácidos nucleicos e de mucina nas células epiteliais intestinais. Desta forma, pode realmente existir uma relação simbiótica entre este microrganismo e o epitélio intestinal, onde este **pode fornecer aminoácidos essenciais críticos para o metabolismo epitelial intestinal** (Catlett et al., 2020).

Segundo a literatura bibliográfica atual, *B. thetaiotaomicron* atua como **um poderoso regulador benéfico do sistema imunológico intestinal**; esta bactéria tem propriedades anti-inflamatórias, pode aumentar a função de barreira da mucosa e limitar igualmente a invasão de outros microrganismos (Sitkin & Pokrotnieks, 2019). Wrzosek et al. (2013) demonstraram que esta espécie exerce um **efeito positivo sobre a espessura e composição da camada de muco** uma vez que: **(i)** aumenta a diferenciação e o número das células caliciformes, presentes no epitélio intestinal; **(ii)** aumenta a expressão do gene da mucina no cólon de ratos gnotobióticos; **(iii)** a sua presença afetou a composição da mucina, com diminuições relativas em oligossacáridos sulfatados e neutros em favor de oligossacáridos sialilados, o que pode significar que esta bactéria necessita de elevados níveis de expressão de mucinas sialiladas para se fixar e colonizar o TGI. Desta forma, parece provocar modificações na linhagem secretora nos ratos, favorecendo a produção de muco e podendo ser determinante para

manter a homeostase epitelial do cólon (Wrzosek et al., 2013). Para além disso, Modasia et al. (2020) verificaram que *B. thetaiotaomicron* está diretamente envolvido na **formação das redes de células enteroendócrinas em todo o TGI**, e que, após a colonização de ratinhos com as estirpes desta espécie bacteriana, os níveis de acetato, succinato e propionato aumentaram no ceco e cólon distal. É conhecido que o propionato estimula a gliconeogénese intestinal e contribui para proteger a integridade da barreira hematoencefálica, enquanto o succinato é um intermediário fundamental em várias vias metabólicas, desempenhando um papel importante na eliminação de ROS (Modasia et al., 2020). Pode igualmente constituir um **papel importante na motilidade colónica**, o que revela que este é um microrganismo essencial para **manter a função intestinal saudável** (Aktar et al., 2020).

Ainda relativamente ao seu poder benéfico sobre o intestino, segundo Zocco et al. (2007), *B. thetaiotaomicron* demonstrou ter **um mecanismo anti-inflamatório único**: é capaz de reverter os danos epiteliais provocados por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , modificando a TEER e a permeabilidade. Este efeito parece estar relacionado à ativação da via Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) por esta bactéria, um efetor a jusante dos recetores *Toll-like*, que participa na regulação das respostas da mucosa à microbiota e cuja ativação é crucial para a proliferação e diferenciação das células epiteliais intestinais. Com base nestas evidências, as estirpes desta espécie bacteriana podem exercer dupla função: a estimulação do mecanismo de defesa da mucosa e a manutenção da homeostase da resposta imune (Zocco et al., 2007). Os mesmos autores sugeriram ainda que este comensal estimula a matrilisina, um importante enzima envolvido na ativação de prodefensinas, produzida nas células de Paneth intestinais. A regulação positiva desses genes contribui para o **fortalecimento da barreira da mucosa intestinal contra microrganismos patogénicos** e evita danos à mucosa pela ativação de componentes do complemento nas secreções intestinais (Zocco et al., 2007).

Tal como outros comensais (por exemplo, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.), também *B. thetaiotaomicron* **desempenha um papel duplo no organismo hospedeiro** - benéfico (protetor) e prejudicial. Sabe-se que esta espécie bacteriana não tem apenas elevada atividade metabólica e diversas funções na influência da atividade intestinal e imunológica, mas também efeitos colitogénicos. Isso aparenta ser uma característica de algumas estirpes

específicas desta espécie com elevada **atividade sulfatase** que são capazes de libertar vesículas da membrana externa (OMVs), consideradas **veículos de patogenicidade**, uma vez que transportam fatores de virulência e os transferem a células alvo localizadas, frequentemente, em regiões distantes do intestino. O seu conteúdo inclui igualmente várias enzimas, componentes da parede celular, ácidos nucleicos, proteínas antimicrobianas etc., podendo atravessar a camada de muco intestinal e interagir diretamente com as células imunes abaixo do epitélio (Sitkin & Pokrotnieks, 2019). No entanto, embora possam ser condutoras da potencial patogenicidade bacteriana, as OMVs são reconhecidas como um modo de comunicação, entre as bactérias e os tecidos do hospedeiro, podendo exercer igualmente funções benéficas, uma vez que contribuem para a degradação de polissacáridos, proteínas e lípidos na bactéria recetora, auxiliando o seu crescimento (Durant et al., 2020; Hiippala, 2020; Zafar & Saier, 2021).

Durant et al. (2020) sugeriram que, as OMVs libertadas por este comensal intestinal, são cruciais no direcionamento de uma resposta imunológica equilibrada aos constituintes da microbiota em indivíduos saudáveis, mas que é alterada em pacientes com DIIs, nomeadamente doença de Crohn e colite ulcerativa. Demonstraram que, embora a IL-10 seja a principal citocina produzida localmente pelas células dendríticas do cólon, em resposta às OMVs do *B. thetaiotaomicron* em indivíduos saudáveis, na verdade, ocorreu uma perda de resposta regulatória dessa citocina fundamental à homeostase intestinal, em pacientes com aquelas patologias. Associado a isso, observaram igualmente números reduzidos de células dendríticas CD103⁺ no cólon desses pacientes, em comparação com os indivíduos saudáveis. Assim, de forma resumida, os autores demonstraram que as OMVs produzidas por este microrganismo podem **contribuir para o meio inflamatório do intestino**, uma vez que uma resposta comprometida das células dendríticas da mucosa face a estas vesículas pode conduzir ao descontrolo de algumas respostas sistémicas e, conseqüentemente, ao aparecimento (ou agravamento) de patologias intestinais (Durant et al., 2020).

Este comensal apresenta igualmente **atividade sialidase**, conduzindo à libertação de ácido siálico (o açúcar terminal das moléculas glicosiladas da mucosa do epitélio intestinal) para obter acesso aos glicanos subjacentes que podem ser usados como fonte de carbono. O

ácido siálico que este microrganismo liberta do muco pode ser catabolizado por bactérias patogênicas, como *Clostridium difficile* e *Salmonella enterica* Typhimurium, o que lhes confere vantagem para proliferar (Curtis et al., 2015).

Para além disso, dentro do intestino, *B. thetaiotaomicron* degrada polissacáridos complexos em monossacáridos que podem ser facilmente usados por espécies bacterianas não glicofágicas, como *Escherichia coli* e *Citrobacter rodentium*. O microrganismo patogénico entérico *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) causa diarreia grave, colite hemorrágica e a síndrome hemolítico-urémica, aderindo intimamente aos enterócitos do epitélio intestinal. Curtis et al. (2015) provaram que este patobionte é residente nos locais de fixação da EHEC. ***B. thetaiotaomicron* aumenta a expressão do gene de virulência da EHEC** através do fator de transcrição, Cra, que deteta flutuações nas concentrações de açúcar. Além disso, identificaram-se metabolitos – lactato, glicerato e, sobretudo, succinato - que se encontram aumentados em locais de infecção específicos deste organismo, principalmente envolvidos no stress oxidativo, síntese de nucleótidos e gliconeogénese. Os resultados desse estudo, em conjunto, indicam que a ação direta desta espécie poderia funcionar como um sinal específico que prepara a EHEC para uma interação mais eficiente com as células hospedeiras, aumentando assim o seu potencial de virulência. Ou seja, os resultados desse estudo sugerem que, um membro normalmente benéfico da microbiota, **tem a capacidade de aumentar a virulência e a progressão da doença mediada por um microrganismo entérico**, alterando o ambiente metabólico em direção a um ambiente gluconeogénico e segregando grandes quantidades do metabolito succinato dentro do intestino que, curiosamente, é interpretado pela EHEC como uma pista nutricional para ativar a expressão do gene de virulência. Ou seja, a partir dessas evidências compreende-se que a composição da microbiota tem impacto na suscetibilidade e progressão de doenças provocadas por outros microrganismos patogénicos (Curtis et al., 2015).

A propósito, os mesmos autores confirmaram que este microrganismo afeta *C. rodentium* de maneira semelhante, aumentando a fisiopatologia associada à infecção por essa bactéria, aumentando o edema do epitélio colónico e a infiltração imunológica, exacerbando a destruição da cripta e comprometendo a reparação do epitelial intestinal (Curtis et al., 2015).

Este microrganismo intestinal está presente, nos resultados obtidos deste trabalho, **apenas nas ninhadas expostas à AFB1**, o que significa que esta micotoxina potenciou o crescimento de um patobionte que não foi detetável na microbiota normal dos ratinhos descendentes controlo, e que **pode desempenhar tanto funções benéficas quanto prejudiciais**. Possivelmente esta bactéria, embora tenha sido estimulada a proliferar pela micotoxina, pode conjecturar-se que não produza, na maioria das vezes, efeitos prejudiciais no intestino dos ratinhos, mas somente quando estes estiverem predispostos a isso, por exemplo, por alguma condição que possa criar suscetibilidade imunológica ou numa situação de desequilíbrio da microbiota intestinal saudável. Nesse caso, a micotoxina estará a estimular o crescimento de um microrganismo que pode, na realidade, causar inúmeros problemas a nível intestinal, destacando-se a sua atividade sulfatase e sialidase, bem como a capacidade de estimular o crescimento de bactérias entéricas e de piorar o prognóstico de infeções provocadas por estas.

Passando a analisar as espécies bacterianas identificadas **somente no microbioma intestinal das ninhadas controlo**, aquelas que pareceram relevantes do ponto de vista bibliográfico incluem *Bacillus cereus*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Anaerostipes caccae*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Peptococcus niger*.

Bacillus cereus é um anaeróbio facultativo Gram-positivo, que, devido à sua distribuição onnipresente em produtos alimentícios – como esparguete, arroz, laticínios e produtos de leite em pó, carne, frango, vegetais e frutas - é ingerido em pequenas quantidades e torna-se parte da **microbiota intestinal humana transitória** (Kotiranta et al., 2000; Bottone, 2010). Nesse sentido, esta espécie é descrita como “uma causa importante de **intoxicação alimentar** em humanos, um risco para a segurança alimentar e um agente etiológico para uma variedade de doenças intestinais e extraintestinais”. As manifestações clínicas decorrentes de uma infeção por aquele microrganismo incluem gastroenterite, vómito, endoftalmite, infeções do trato respiratório e infeções semelhantes à gangrena (Andersson et al., 2007; Tuipulotu et al., 2020). Este microrganismo oportunista está associado principalmente a **dois tipos de doenças gastrointestinais**, a síndrome diarreica (infeção) e a doença emética (intoxicação). A primeira é causada por enterotoxinas - a

hemolisina BL (HBL), enterotoxina não hemolítica (NHE) e a citotoxina K (CytK) - produzidas após a ingestão de bactérias viáveis ou esporos (Jeßberger et al., 2014), enquanto que a segunda é devido à cereulida, um dodecadepsipeptídeo produzido por *B. cereus* em vários alimentos, antes da ingestão. Esta é uma potente toxina mitocondrial, altamente lipofílica, resistente a ácidos e a elevadas temperaturas, e rapidamente absorvida, passando pelas barreiras intestinais para a corrente sanguínea e, desta, para todo o corpo (Paananen et al., 2002). Foi proposto em estudos anteriores que as suas principais vias de citotoxicidade sejam **(i)** a alteração dos gradientes celulares de K^+ ; **(ii)** a alteração da função mitocondrial; **(iii)** a inibição da proliferação celular e síntese de RNA e **(iv)** a sua motilidade em células humanas e animais (Andersson et al., 2007). A cereulida forma um complexo estável com os iões K^+ , que destrói o gradiente de potencial eletroquímico na membrana lipídica e faz com que as mitocôndrias aumentem de volume; está provado que a cereulida causa despolarização mitocondrial e diminui a respiração mitocondrial máxima. Assim, a exposição a esta toxina agrava a acumulação de ROS, ativa a via de stress mitocondrial e causa a libertação de citocromo c no citoplasma, contribuindo para processos apoptóticos (D. Li et al., 2021).

Existem inúmeros fatores de virulência produzidos pelo *B. cereus*, para além da cereulida, que incluem toxinas formadoras de poros, hemolisinas, enterotoxinas, proteases e fosfolipases, que danificam as células epiteliais próximas pela formação de poros, resultando em danos às microvilosidades e lise osmótica das células epiteliais do hospedeiro (Dupont et al., 2016; Tuipulotu et al., 2020).

Tão importante quanto o movimento ativo em direção ao epitélio intestinal é a capacidade do *B. cereus* de permanecer lá. As estirpes desta espécie são capazes de **aderir e degradar a mucina gástrica** e usá-la como substrato de crescimento (Jessberger et al., 2020). Os seus esporos são considerados responsáveis pela germinação ou persistência no intestino delgado e **modulação das condições intestinais**; desta forma, pode sobreviver mais tempo do que outras espécies do mesmo género uma vez que os seus esporos lhe permitem aderir de forma eficiente às células epiteliais humanas devido à sua hidrofobicidade (K. Lee et al., 2019). Foram também encontradas evidências de que a enterotoxina FM, produzida por esta espécie, pode estar envolvida na formação de biofilmes, motilidade, bem como na

adesão às células epiteliais, aumentando significativamente a sua fixação a essas células, e, consequentemente, a sua virulência (Jessberger et al., 2020; Dietrich et al., 2021).

Bacillus spp. também expressam vários genes que lhes permitem produzir aminas biogénicas, cujas mais estudadas são a histamina e a tiramina, devido às suas potenciais ações fisiológicas e efeitos toxicológicos. Essas aminas são particularmente **tóxicas para a linha celular intestinal HT-29**, quando em concentração elevada, podendo causar riscos toxicológicos consideráveis, como dificuldade respiratória, palpitações cardíacas e vários distúrbios alérgicos (K. Lee et al., 2019).

Embora não seja tipicamente encontrado em estudos do **microbioma do leite materno**, os esporos do *B. cereus* representam um problema significativo nas amostras do leite da mãe. É frequente, na terapia intensiva neonatal, que os bebés prematuros sejam alimentados com leite humano de um dador, como suplementação ao leite materno. Usando métodos dependentes de cultura, *B. cereus* foi identificado em 9,2% de 152 amostras de leite cru desses dadores. O leite materno misturado com outro tipo de leite do dador, tem sido associado a **infecções graves ou fatais pelo *B. cereus* em bebés prematuros**, embora outras descrições deste tipo de casos tenham sugerido que a fonte mais provável para a infeção tenha sido o próprio ambiente hospitalar (Egan et al., 2021).

No entanto, os membros do género *Bacillus* não representam apenas um risco à saúde humana intestinal. Atualmente, são consideradas das espécies mais promissoras como **probióticos** para utilização em rações animais graças à sua extraordinária vida útil e resistência às condições ambientais – devido ao facto de serem bactérias esporuladas - em comparação com os probióticos convencionais (Kasmani et al., 2012); igualmente devido à sua capacidade de: **(i)** produzirem péptidos antimicrobianos e pequenas moléculas efetoras extracelulares; **(ii)** interagirem com o hospedeiro com a ajuda de recursos de adesão e fixação; **(iii)** atenuarem a disbiose e a inflamação intestinal, em vários modelos animais *in vitro* e *in vivo*, equilibrando a flora intestinal em direção à população microbiana benéfica, auxiliando assim a recuperar a mucosa intestinal de lesões causadas por algumas patologias (Elshagabee et al., 2017). Conhecidas por produzirem metabolitos secundários favoráveis, e por promoverem imunidade contra vários microrganismos patogénicos, as espécies de

Bacillus são consideradas fontes atraentes de várias enzimas hidrolíticas extracelulares que podem auxiliar na digestão dos nutrientes presentes nos alimentos (Bernardeau et al., 2017).

As estirpes de *Bacillus* spp. também já demonstraram possuir **propriedades de ligação a micotoxinas**. Kasmani et al. (2012) isolaram centenas de estirpes probióticas deste género, do trato digestivo de aves domésticas, provando terem **capacidade de ligação às aflatoxinas**, e particularmente, à AFB1 (Kasmani et al., 2012). Além disso, Weekley et al. (1989) incubaram 8 espécies de bactérias com 10 µg/mL de **AFB1**, de forma a compreender os efeitos dessa micotoxina nas culturas microbianas em várias condições experimentais. Os investigadores observaram que em todas as espécies de bactérias estudadas, a AFB1 diminuiu substancialmente os tamanhos das culturas em 4 dias, mas o mesmo não aconteceu em 8 dias. Na cultura de *B. cereus*, o tamanho da colónia foi aumentado por esta micotoxina após 8 dias da inoculação. Esses resultados sugerem que a AFB1 impediu o crescimento inicial dessas espécies *in vitro*, embora o crescimento posterior, passado 8 dias, tenha sido intensificado. O mecanismo causal para esse fenómeno não é conhecido, embora se possa conjecturar que a densidade inicial reduzida de todas as espécies na presença da aflatoxina reflita um ajuste da bactéria a essas condições tóxicas, por isso, provavelmente, após adaptação a esse ambiente, essas bactérias degradam a aflatoxina, resultando depois numa densidade das colónias bacterianas normais e aumentadas. No entanto, são necessários mais estudos para estabelecer a relação do crescimento desta espécie bacteriana com os efeitos das micotoxinas, ao longo do tempo, nas suas colónias (Weekley et al., 1989).

Por outro lado, quando Abdel-Shafi et al. (2018) conduziram um estudo - cujo objetivo foi encontrar novos microrganismos capazes de degradar aflatoxinas e igualmente inibir as espécies fúngicas que as produzem - os resultados indicaram que *B. cereus* MG751322 teve uma elevada capacidade de degradar aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), onde a percentagem e temperatura de degradação foram de 98% (após 24h de incubação) e 37 °C, respetivamente. Este estudo mostrou **mais de 90% de degradação de aflatoxinas por este microrganismo**, que foi considerado uma potencial espécie bacteriana para ser utilizada em biorremediação e desintoxicação destas micotoxinas a nível alimentar (Abdel-Shafi et al., 2018).

Esta espécie bacteriana também é conhecida por produzir AHL lactonases - uma família de metaloenzimas bacterianas - que podem hidrolisar a ligação éster do anel de lactona, sugerido como o principal componente estrutural causador da toxicidade da AFB1. Pensa-se que, com a quebra desse anel de lactona da aflatoxina, se produza um composto não fluorescente com atividade biológica, mutagenicidade e toxicidade significativamente reduzidas, resultando na formação de produtos menos tóxicos. Assim, a atividade desse tipo de enzimas microbianos produzidos pelo *B. cereus* podem ser candidatos promissores para processos de **degradação e descontaminação de micotoxinas**. Por exemplo, Pereyra et al. (2019) provaram a degradação da AFB1, tanto intra como extracelular, por 11 estirpes de *Bacillus sp.* produtoras de AHL. Caso estas estirpes demonstrem ser seguras quando aplicadas a animais, podem futuramente ser utilizadas para a desintoxicação desta micotoxina em rações contaminadas (González Pereyra et al., 2019, 2020).

Tal como *B. cereus*, também *Stenotrophomonas maltophilia* tem interesse na desintoxicação biológica da AFB1, principalmente porque o faz de forma constitutiva, por um mecanismo enzimático, e não por ligação celular, como a maioria dos membros dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, por exemplo. Guan et al. (2008) realizaram uma pesquisa, que teve como objetivo procurar novas bactérias que degradassem a AFB1, e descobriram que o isolado 35-3 da *S. maltophilia*, obtido de fezes de anta, **reduziu a AFB1 em 82,5%** após incubação em meio aeróbico líquido a 37 °C por 72h. O aumento contínuo na desintoxicação pela *S. maltophilia* com o tempo indicou que o habitual mecanismo de ligação utilizado por outras bactérias pode não desempenhar um papel importante na redução da AFB1 neste caso, e provou-se que a degradação foi feita de forma enzimática e sem ser necessária qualquer exposição prévia ao contaminante alimentar; essa capacidade foi alcançada durante o seu crescimento normal, sugerindo que foi uma atividade constitutiva da bactéria (Guan et al., 2008). Ou seja, isto quer dizer que não é necessário que a amostra a analisar esteja exposta previamente à AFB1 para que este microrganismo consiga atuar e consiga degradá-la; portanto, nos resultados obtidos da presente dissertação, mesmo estando presente só nas ninhadas controlo, e mesmo que a exposição à AFB1 não tenha proporcionado o seu crescimento, é interessante perceber que, no microbioma como um todo,

esta espécie bacteriana pode auxiliar na degradação da micotoxina, quer tenha sido exposta previamente a ela ou não. Embora sejam necessários mais estudos que comprovem esta capacidade de degradação noutros modelos animais, pode supor-se, através destas evidências, que *S. maltophilia* pode contribuir para a minimização do eventual aparecimento dos efeitos provocados pela AFB1 no microbioma intestinal.

Existem também referências que este microrganismo é um **emergente microrganismo patogénico humano oportunista global e nosocomial**, resistente a múltiplos antibióticos; pode habitar em quase qualquer ambiente aquático ou húmido, mas não é geralmente considerado altamente virulento. No entanto, na última década *S. maltophilia* tem sido frequentemente estudada por estar associada a taxas significativas de fatalidade em certas populações de pacientes, particularmente em indivíduos gravemente debilitados, hospitalizados ou imunocomprometidos (Brooke, 2012; An & Berg, 2018; E. J. Kim et al., 2019). Este organismo pode levar a doenças invasivas a nível pulmonar e urinário, **infeções gastrointestinais**, oculares e dos tecidos moles, bem como otite. A síntese de enzimas extracelulares (proteases, lipases e lecitinase), biofilmes, formação de cápsula, motilidade bacteriana e *quorum sensing* parecem ser decisivos na sua patogenicidade (Adegoke et al., 2017; Klimkaité et al., 2020). Para além disso, esta é uma bactéria **parasitária extracelular, que geralmente regula a função imunológica do hospedeiro**, através de proteínas da membrana externa, flagelina ou fibrina.

Até ao momento, existem poucos estudos que revelem o papel de *S. maltophilia* no sistema imunológico do hospedeiro, no entanto, Wang et al. (2021) verificaram que havia um mecanismo especial de resposta entre as estirpes dessa espécie bacteriana e as células T, que poderia afetar todo o processo de interação imunológica. Embora esta espécie bacteriana possa ativar células T para segregar uma grande quantidade de citocinas e expressar marcadores de ativação, conduz posteriormente, a um estado de exaustão. Ou seja, descobriu-se que esta bactéria é diferente de outros parasitas extracelulares e não promove a regulação positiva da função imunológica do paciente, mas **pode conduzir à apoptose maciça dos linfócitos T**. Os resultados do estudo mostraram que células T estimuladas pela *S. maltophilia* segregaram uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e

TNF- α . Estas promovem outros linfócitos para iniciar processos de necrose e de morte programada, nomeadamente a apoptose, e encontram-se muitas vezes aumentadas em pacientes com DIIs (M. Wang et al., 2021). Particularmente, o aumento do IFN- γ induz a morte das células de Paneth intestinais e diminui a expressão das proteínas das TJ (Watson et al., 2005; Smyth et al., 2011; Eriguchi et al., 2018). O aumento na sua sinalização pode exercer efeitos prejudiciais no epitélio, modificando a função de barreira intestinal, aumentando a permeabilidade e, facilitando assim, a invasão por bactérias patogénicas no epitélio intestinal (Ruder et al., 2019). Nesse estudo, também a expressão das células T CD4⁺ e T CD8⁺ na superfície celular diminuiu, acompanhada pela ativação da via proteína 1/ligando 1 da morte celular programada (PD1/PD-L1), que acabou por conduzir à apoptose maciça das células T. Desta forma, comprova-se o **efeito inibitório e imunossupressor da *S. maltophilia* na imunidade celular** (M. Wang et al., 2021).

Bacteroides xylanisolvens é um membro do género *Bacteroides* que possui o maior repertório de genes glicolíticos para a degradação do xilano, tendo capacidade de o metabolizar em acetato, propionato e succinato (Chassard et al., 2008; M. Zhang et al., 2014). Os xilanos não são degradados pelas enzimas digestivas humanas no trato digestivo superior e, portanto, atingem o cólon, onde são submetidos à degradação extensiva por estes membros da microbiota simbiótica (Philippe Ulsemer et al., 2012; Despres et al., 2016). Para além de ser uma bactéria com elevada atividade xilanolítica, também é considerada uma **bactéria pectinolítica intestinal**, ou seja, com capacidade de degradação das pectinas - fibras alimentares altamente consumidas - que contribui para a sua aptidão competitiva no ecossistema intestinal humano (Despres, 2016).

Segundo Ulsemer et al. (2012) esta é a primeira espécie **probiótica natural** do género *Bacteroides*; os autores demonstraram que a estirpe DSM 23964 dessa espécie é “resistente à ação de enzimas do suco gástrico e intestinal, pouco provável de transferir ou adquirir resistência a antibióticos e **livre de qualquer atividade de virulência**” descrita para aquele género; foi provada a ausência de quaisquer propriedades patogénicas *in vivo* de células viáveis de *B. xylanisolvens* DSM 23964 através de um modelo murino (Philippe Ulsemer, 2012). Considerado um organismo **não oportunista**, a sua **não patogenicidade** já foi

avaliada através da verificação da existência de enzimas extracelulares, fatores de virulência e resistência a antibióticos *in vitro*, parâmetros hematológicos, marcadores inflamatórios séricos e valores de enzimas hepáticas em animais e humanos (Philippe Ulsemer et al., 2012; Tan et al., 2019). Para além disso, também já se demonstrou que esta estirpe não possui atividades de exoenzimas que se sabe que estão envolvidas no desenvolvimento do processo de infecção como colagenase, neuraminidase, DNase, hialuronidase, condroitina sulfatase, ou atividade hemolítica. Assim, presumiu-se que é seguro utilizar esta estirpe probiótica inativada no desenvolvimento de novos alimentos funcionais e que se pode evitar preocupações sobre possíveis efeitos colaterais indesejados, que podem surgir após a ingestão crónica de qualquer estirpe probiótica viva (Philippe Ulsemer, 2012). Utilizando a linha celular Caco-2, foi observado que a estirpe DSM 23964 de *B. xylanisolvens* não se liga de forma estável aos enterócitos humanos, o que constitui mais uma prova da sua **não patogenicidade no intestino humano** (Philippe Ulsemer et al., 2012).

Ulsemer et al. (2016) demonstraram ainda que a suplementação oral regular com *B. xylanisolvens* pasteurizado aumentou a geração de anticorpos IgM específicos para o TF α em humanos adultos. Estes anticorpos naturais são dirigidos contra o antígeno TF α , que é um antígeno específico da superfície de células tumorais da maioria dos tipos de carcinoma; significa isto que, muito provavelmente, esta espécie tem influência na **redução do risco de aparecimento do cancro**. Assim, é possível que, através da estirpe DSM 23964, se consiga desenvolver um novo fármaco que fortaleça o sistema imunológico e reduza o risco de desenvolvimento de cancro em humanos adultos saudáveis (P. Ulsemer et al., 2016).

Como nos resultados da análise do *core microbiome*, esta espécie bacteriana surge apenas nas ninhadas controlo, significa que *B. xylanisolvens* faz parte da microbiota normal saudável destas ninhadas, não apresentando qualquer potencialidade inflamatória no intestino fetal e demonstra ter ainda funções que são benéficas para a saúde humana, incluindo (i) atividades metabólicas únicas; (ii) prevenção da colonização do intestino por organismos patogénicos; (iii) produção de SCFAs que podem ter propriedades anti-inflamatórias, propriedades anticancerígenas e efeitos imunomoduladores, envolvidos no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro.

Colonizador do lúmen intestinal e um dos maiores **produtores de butirato intestinal**, *Anaerostipes caccae* é detetado no início da vida e é um dos membros prevalentes da microbiota intestinal em humanos adultos (Schwiertz et al., 2002; Abbeele et al., 2013; L. Chia et al., 2018; Ose et al., 2018). Já foi demonstrada a sua importância no contexto das interações microbiota-hospedeiro, devido à presença de *pilli* tipo IV - os principais filamentos de interação das bactérias, com uma ampla gama de funcionalidades - e o seu efeito benéfico na redução de alergias alimentares mais tarde na vida. A esse respeito, existem evidências de que, alterações no microbioma intestinal no início da vida, estimulam a imunidade da mucosa intestinal do hospedeiro e podem desempenhar um papel crítico no aparecimento de alergias. Essas mudanças podem influenciar etapas-chave no desenvolvimento do microbioma intestinal do bebé, e ter efeitos de longo prazo na imunidade do hospedeiro que se manifestam, posteriormente, no surgimento de várias patologias.

Feehley et al. (2019) demonstraram que a proteção contra as alergias alimentares em ratos *germ-free*, que receberam um transplante de microbiota fecal infantil, estava associada ao *A. caccae*, **que melhorou a resposta alérgica à β -lactoglobulina**; esta espécie reduziu a expressão de linfócitos Th2, de anticorpos (IgE e IgG1), da expressão da acil-coenzima A tioesterase 12 (Acot12), bem como diminuiu respostas de citocinas IL-13 e IL-4, que promoveram tolerância oral à alergia ao leite de vaca. Ou seja, este microrganismo foi descrito como tendo importância no reforço das funções de barreira epitelial e na minimização do aparecimento de alergias alimentares no início de vida (Feehley et al., 2019; K. H. Lee et al., 2020; Turrone et al., 2020; Rachid et al., 2021).

Todas as espécies descritas anteriormente (*Bacillus cereus*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Anaerostipes caccae* e *Stenotrophomonas maltophilia*) foram detetadas somente nas ninhadas controlo, o que parece indicar que estes microrganismos não colonizaram o intestino dos descendentes quando, posteriormente, as fêmeas progenitoras foram expostas ao contaminante alimentar, ou seja, nas ninhadas tratadas. Isto pode acontecer porque algumas espécies bacterianas conseguem metabolizar os nutrientes disponíveis no intestino de uma forma mais eficiente, o que lhes confere uma vantagem competitiva, impedindo a proliferação de outras ou diminuindo consideravelmente o seu ritmo de replicação. Por outro

lado, frequentemente, estão presentes em quantidades tão reduzidas, que a sua abundância relativa não é detetável.

É importante referir também que num ambiente intestinal altamente competitivo, a microbiota tem várias estratégias de sobrevivência que levam à coexistência com outros microrganismos e células hospedeiras, nomeadamente por forças ecológicas e **relações de alimentação cruzada** que mantêm as comunidades bacterianas unidas no intestino, e que podem ter um impacto no hospedeiro de forma benéfica ou prejudicial (Carbonero et al., 2012; Gurry, 2017). *A. caccae* encontra-se associado a várias destas interações com outros microrganismos que já foram descritos anteriormente (*Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Desulfovibrio piger*) e cujo papel pode ser interessante ao nível do intestino fetal.

Por exemplo, sabe-se que o desenvolvimento da microbiota intestinal infantil é fortemente influenciado pela nutrição. Os HMOs são hidratos de carbono não digeríveis com funções pré-bióticas que, no leite materno, promovem seletivamente o crescimento e a atividade de microrganismos específicos no intestino do bebé. Chia et al. (2020) investigaram a **interação trófica entre *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Anaerostipes caccae***, ambos colonizadores do intestino no início de vida, e este último, produtor de butirato na presença de hidratos de carbono (L. Chia et al., 2020). Os resultados demonstraram que *A. caccae* utilizou monossacáridos derivados do *B. thetaiotaomicron*, também acetato e D-lactato, para o seu próprio crescimento e produção concomitante de butirato. Ou seja, *A. caccae*, não sendo capaz de metabolizar a lactose ou os HMOs, é dependente dos intermediários produzidos por *B. thetaiotaomicron* para o seu crescimento, podendo utilizar monossacáridos livres, ou seja, glicose e galactose, libertados por esse microrganismo, do catabolismo dos hidratos de carbono. Este estudo fornece uma prova de que esta espécie bacteriana pode conduzir à rede metabólica butirogénica no intestino do bebé, potenciando a colonização do *A. caccae*, que produz butirato, **essencial para a homeostase do intestino infantil** (L. Chia et al., 2020).

Neste caso, é interessante perceber que, considerando o microbioma intestinal, pode existir interação entre estas duas espécies bacterianas que, curiosamente, nos resultados deste

trabalho, colonizaram apenas nas ninhadas expostas à AFB1, como *B. thetaiotaomicron*, e exclusivamente nas ninhadas controlo, como *A. caccae*. Isto evidencia a complexidade das interações que ocorrem no microbioma intestinal e de como as bactérias podem, de facto, ter um papel duplo nas funções que desempenham (patogénico e benéfico). Mesmo bactérias com potencialidade patogénica no intestino, que é o caso do *B. thetaiotaomicron*, podem interagir com as bactérias benéficas para o seu próprio proveito/benefício e ainda potenciar o crescimento desses microrganismos fornecendo-lhes substratos importantes, sendo tal interação fundamental para a homeostase intestinal - a chamada **simbiose mutualística**.

Um estudo de Belzer et al. (2017) demonstrou um outro princípio **da interação microbiana na camada de muco intestinal**. A degradação e fermentação do muco por *A. muciniphila* são conhecidas por resultar na libertação de oligossacáridos e subsequente produção de acetato, que se torna diretamente disponível para os microrganismos nas proximidades da mucosa intestinal. Nesse estudo, as culturas da *A. muciniphila* com *A. caccae* - que, embora produza butirato intestinal, não degrada o muco - resultaram num crescimento sintrófico e na produção de butirato, predominantemente pela via do acetyl-CoA. Ou seja, esses autores provaram que as cadeias de oligossacáridos indigeríveis dentro do muco se tornaram disponíveis para uma ampla gama de microrganismos intestinais, após a degradação e libertação de açúcares por *A. muciniphila*. Isso leva à síntese microbiana de vitamina B12, 1,2-propanodiol, propionato e butirato, que são benéficos ao ecossistema microbiano e às células epiteliais hospedeiras. Estes resultados sugerem que, de facto, há uma simbiose mutualística devido à existência de cadeias tróficas no muco entre a *A. muciniphila*, *A. caccae* e outras espécies bacterianas (Belzer et al., 2017). Por outro lado, Chia et al. (2018) demonstraram igualmente que a presença do *A. caccae* induziu alterações na resposta transcricional de *A. muciniphila*, com aumento da expressão de genes de degradação da mucina e redução da expressão de genes ribossomais; isso indicou que *A. muciniphila* mudou a sua regulação transcricional em resposta ao *A. caccae*. Portanto, observou-se uma **dependência ecológica entre uma espécie que degrada mucina e uma espécie produtora de butirato** (L. W. Chia et al., 2018).

Neste caso, as duas espécies descritas anteriormente, tinham uma abundância relativa mais elevada nas ninhadas controlo, o que prova que pode ocorrer uma eventual relação de mutualismo entre duas espécies presentes naturalmente no microbioma intestinal, e cuja interação pode ser benéfica ao feto.

Embora também possa desempenhar um papel benéfico no intestino saudável (Blachier et al., 2010), a **formação de sulfureto de hidrogénio pelas SRBs**, como dito anteriormente, tem sido associada a condições de DII. O lactato é um co-substrato potencialmente importante para muitas SRBs. Duncan et al. (2004) descreveram duas espécies bacterianas, *Eubacterium hallii* e *Anaerostipes caccae*, que podem usar estereoisómeros D- e L-lactato, sugerindo isso que, dentro da complexa comunidade microbiana intestinal, as SRBs podem estar em competição direta pelo lactato com essas bactérias produtoras de butirato, que utilizam lactato como substrato (Duncan et al., 2004). Curiosamente, Marquet et al. (2009) realizaram um estudo onde mostram que, efetivamente, *D. piger* DSM749 compete com outras bactérias por lactato e hidrogénio. Este último é produzido por várias espécies incluindo *A. caccae*, e este hidrogénio adicional **pode contribuir para o forte crescimento e formação contínua de sulfureto pelas SRBs**. Uma possível consequência adicional da competição por lactato, entre as SRBs e bactérias que o utilizam, é uma **tendência a diminuir a produção de butirato a partir do lactato**; o butirato é importante para a saúde intestinal, pois é o principal combustível para os colonócitos e atenua as respostas inflamatórias. Por outro lado, a formação de sulfureto pelo *D. piger* não foi afetada pelo *A. caccae* nessas co-culturas, o que significa que o lactato pode estimular a formação de sulfureto pelas SRBs presentes no cólon, com possíveis consequências para condições como a colite, uma vez que o sulfureto também é conhecido por comprometer (e mesmo inibir) a oxidação do butirato. Assim, esse estudo demonstrou que existe competição entre as várias bactérias presentes no microbioma, e que isso pode resultar num **desequilíbrio microbiano (disbiose)** acompanhado por uma redução nas populações de outras bactérias que utilizam lactato e que produzem butirato (Marquet et al., 2009).

É curioso observar que, na literatura bibliográfica anterior (Duncan et al., 2004; Marquet et al., 2009; Blachier et al., 2010) são mencionadas duas espécies bacterianas (e

uma possível competição microbiana por lactato entre elas), que nos resultados obtidos deste trabalho, colonizaram somente nas ninhadas controlo (*A. caccae*) ou exclusivamente nas ninhadas dos descendentes cuja fêmea foi exposta à AFB1 (*D. piger*). É demonstrado que, mesmo que *A. caccae* seja uma bactéria benéfica em muitos aspetos, se produzir hidrogénio de forma excessiva, esse hidrogénio adicional pode contribuir para o forte crescimento e formação contínua de H₂S pelo *D. piger*, ou seja, acaba por **contribuir para a potencialidade inflamatória** desta última bactéria, resultando isso muitas vezes em colite e outros distúrbios intestinais; além disso, pode ocorrer menor produção de butirato a partir do lactato, o que, **naturalmente perturbará a homeostase intestinal.**

Outro microrganismo que é provável que possa contribuir para o metabolismo das SRBs no cólon é o *Peptococcus niger*; um membro Gram-positivo constituinte das membranas mucosas intestinais humanas normais que, nos resultados obtidos, colonizou exclusivamente nas ninhadas controlo (Van Eldere et al., 1991). Esta espécie bacteriana expressa um conjunto de enzimas semelhantes às glicosulfatases, que catalisam a libertação de sulfato das sulfomucinas, embora ainda pouco se saiba relativamente à sua prevalência, abundância e atividade (Carbonero et al., 2012).

Segundo Van Eldere et al. (1988), a função metabólica da atividade das sulfatases intestinais do *P. niger* H4 é fornecer sulfito que funciona como um aceitador de eletrões. O grupo ácido sulfónico da taurina, bem como do sulfito, é rápida e completamente reduzido a H₂S pelo *P. niger* H4. Ou seja, resumidamente, essas sulfatases podem servir para fornecer às SRBs uma fonte alternativa de sulfito, na ausência de outras fontes, para a metabolização posterior em H₂S (Van Eldere et al., 1988, 1991). Por outro lado, as reações de oxidação-redução, entre outras reações, que são catalisadas por esta espécie bacteriana, podem transformar esteroides excretados pela bÍlis, em substâncias biologicamente mais ou menos ativas, e também podem estar associadas à formação de substâncias mutagénicas ou carcinogénicas (Van Eldere et al., 1987). O aumento da atividade da mucina sulfatase, uma enzima pertencente ao grupo das glicosulfatases, foi observada em pacientes com colite ulcerativa em que, na maioria dos pacientes, as flutuações na atividade desse enzima fecal foram associadas ao agravamento do prognóstico da patologia, sugerindo que o aumento da sua atividade contribuiu para a

perpetuação da doença. Assim, os indivíduos geneticamente predispostos a uma elevada abundância relativa de SRBs - que então têm um aumento da atividade da sulfatase - podem estar sob maior risco de contrair colite ulcerativa devido à maior disponibilidade de sulfato endógeno para a produção de **sulfureto de hidrogénio** pelas SRBs (Carbonero et al., 2012). Neste sentido, **P. niger pode contribuir para o metabolismo das SRBs**, incluindo *D. piger* e *B. wadsworthia* que constam nos resultados, e, portanto, contribuir para a sua potencial patogenicidade pela formação daquele composto tóxico.

Relativamente a todas as outras espécies bacterianas que constam na Tabela 12, é provável que também possam desempenhar funções na microbiota fetal, no entanto, não há forma de o comprovar cientificamente, uma vez que não há literatura bibliográfica suficiente que permita descrever o seu papel a nível intestinal. Muitas vezes são espécies recentes, que aparecem de forma insuficiente nas amostras clínicas testadas nos vários artigos e ainda são relativamente pouco estudadas; acontece frequentemente algumas espécies não serem cultiváveis, ou seja, não serem detetáveis por cultura bacteriológica convencional, mas apenas se forem realizados métodos metagenómicos. Noutras, há evidências do seu papel noutros órgãos e tecidos, mas não especificamente no intestino.

4.4. Sequenciação massiva de elevado rendimento independente de PCR

Foram selecionadas algumas amostras para sequenciação de terceira geração (independente de PCR), utilizando o sistema da Millipore, cujos resultados se encontram de seguida nas Figuras 25 e 26 para o género e espécie, respetivamente.

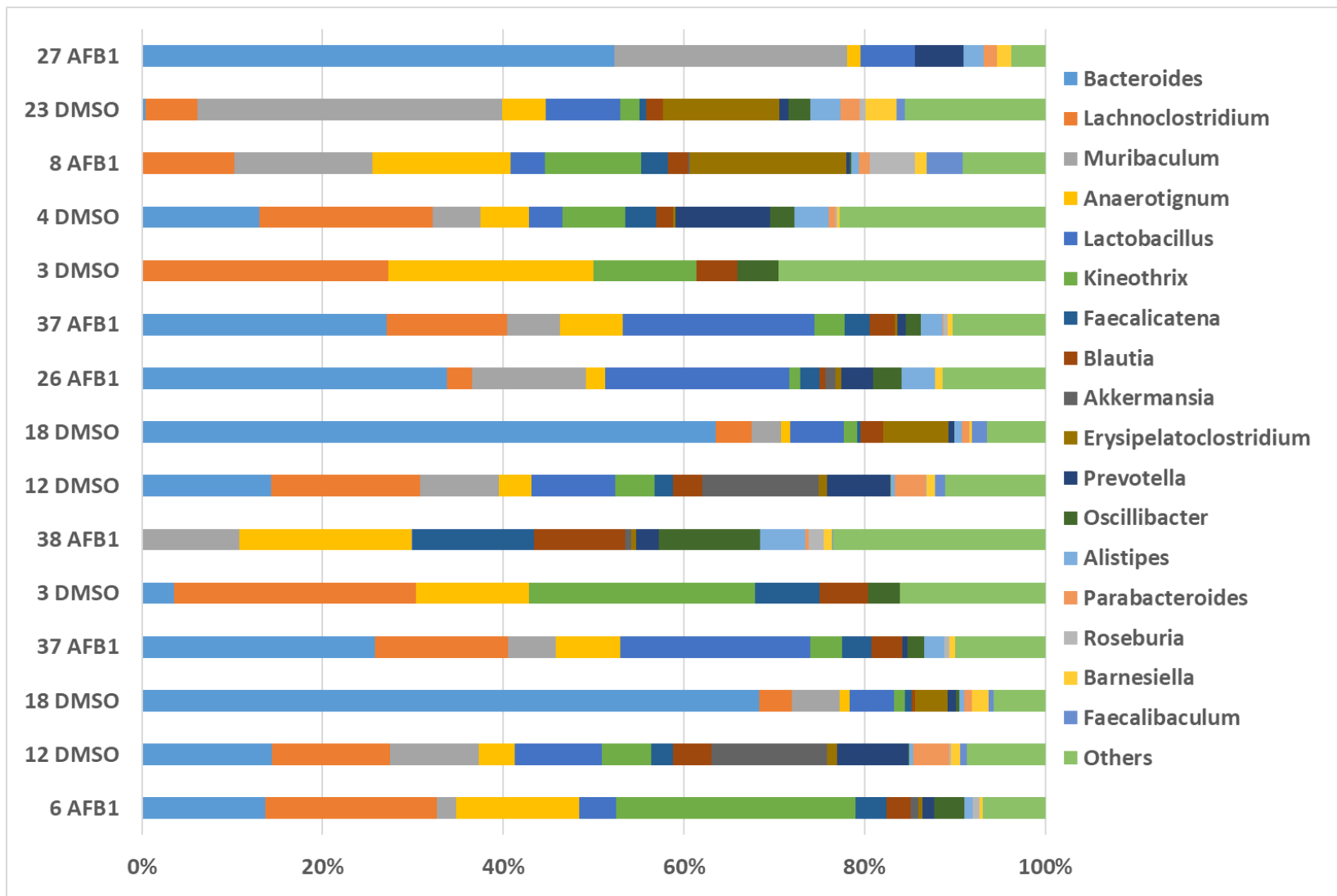


Figura 25: Abundância relativa (%) bacteriana para o Género

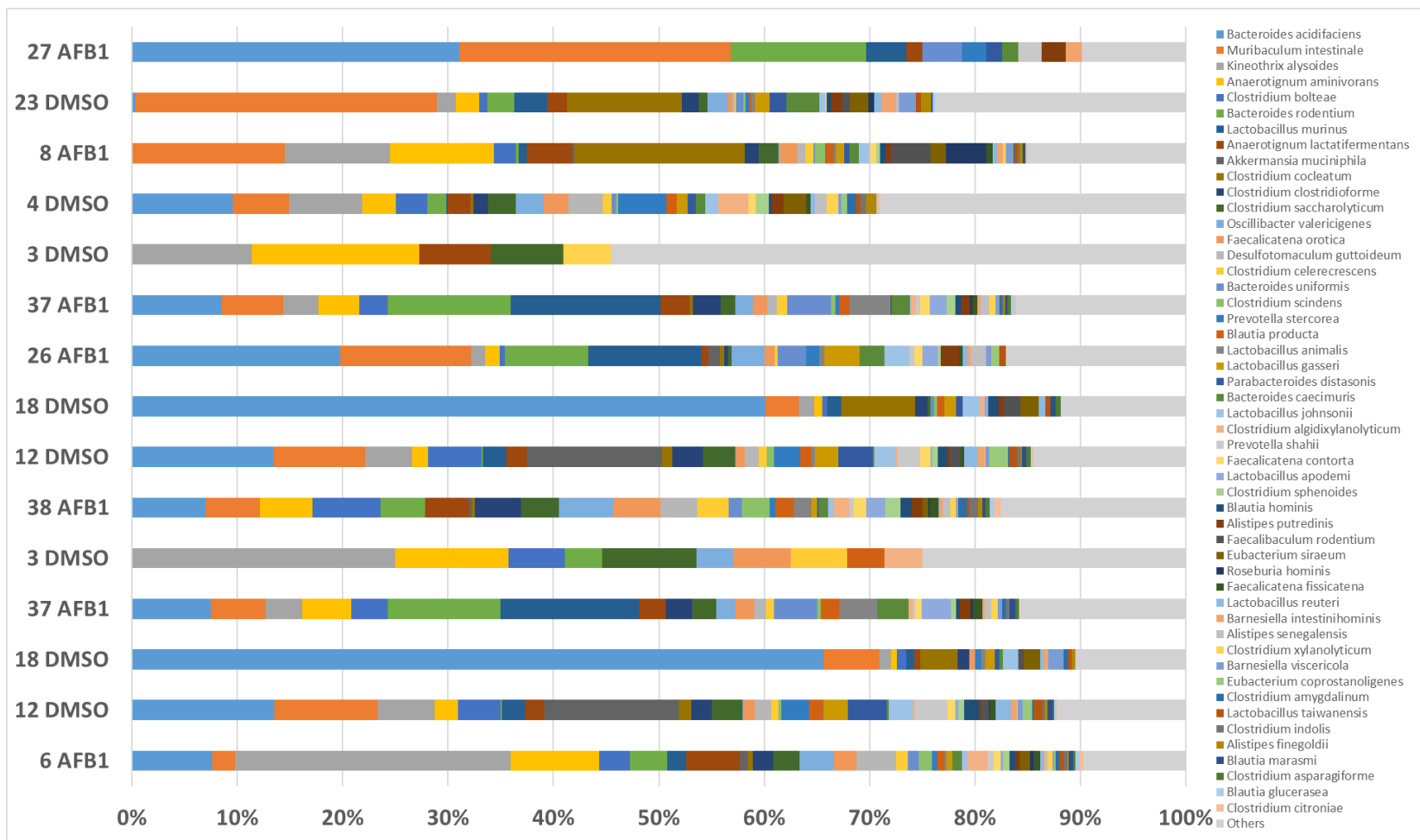


Figura 26: Abundância relativa (%) bacteriana para a Espécie

Pela observação da Figura 25, observa-se que os **gêneros** predominantes correspondem aos *Bacteroides*, *Lachnoclostridium*, *Muribaculum*, *Lactobacillus*, *Kineothrix* e *Anaerotignum*.

Ao nível da **espécie** (Fig. 26) podem identificar-se algumas espécies bacterianas adicionais que não foram identificadas através da plataforma de sequenciação Illumina Miseq, mas somente pelo MiniON™, nomeadamente *Anaerotignum lactatifermentans*, *Anaerotignum aminivorans*, *Clostridium sphenoides*, *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium algidixylanolyticum*, *Clostridium amygdalinum*, *Faecalicatena orotica*, *Faecalicatena fissicatena*, *Faecalicatena contorta*, *Desulfotomaculum guttoideum*, *Blautia producta*, *Blautia marasmi*, *Blautia hominis*, *Roseburia hominis*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus apodemi* e *Kineothrix alysoides*, que são abundantes de forma muito idêntica, tanto nas ninhadas controlo como nas ninhadas expostas à AFB1; *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus johnsonii* e *Bacteroides uniformis* que são maioritárias nas amostras toxinogénicas, comparativamente aos controlos.

Kineothrix alysoides é uma espécie bacteriana **produtora de butirato**, relativamente recente, e ainda existem poucos estudos à cerca da sua possível influência no microbioma intestinal ou sobre a sua importância noutras funções fisiológicas humanas. No entanto, Liddicoat et al. (2020) realizaram um estudo em que os microbiomas intestinais de ratos foram suplementados com esta bactéria derivada do solo e os resultados sugeriram que, o aumento da abundância relativa deste microrganismo raro, se correlacionou com a redução do comportamento semelhante à ansiedade, nos ratos mais ansiosos. Ou seja, teve um **papel semelhante a um fármaco ansiolítico**. Assim, pode supor-se que, muito provavelmente, o solo pode representar uma fonte adicional de bactérias produtoras de butirato, com capacidade de reabastecer o microbioma intestinal dos mamíferos, e com vantagens à saúde intestinal e mental (Liddicoat et al., 2020). O **butirato**, após a absorção pelos colonócitos, é usado localmente como combustível para as células epiteliais da mucosa do cólon e é considerado essencial para a saúde intestinal, estando ligado à homeostase imunológica, proteção contra doenças metabólicas, melhoria da qualidade de vida e redução da depressão; tem igualmente capacidade anti-inflamatória e de reparação dos principais tecidos do sistema

nervoso central (Sanna et al., 2019; Liddicoat et al., 2020). Embora esta espécie seja derivada do solo, Haas e Blanchard (2017) sugerem que *K. alysoides* pode ser um residente normal no intestino ou rúmen de mamíferos, dada a sua faixa de temperatura ideal, que corresponde à temperatura interna de humanos e animais de grande porte. Igualmente depois do estômago (pH <3), os valores médios de pH variam ao longo do trato intestinal humano do duodeno ao reto, e nas fezes, mas encontram-se dentro da faixa de pH 5,5 a 8,0 que também é adequado para *K. alysoides* (Haas & Blanchard, 2017). Curiosamente, detetou-se esta espécie bacteriana em ratos com uma presença crescente em várias amostras fecais, em todos os tratamentos. Assim, com base nesses resultados pode conjecturar-se que a microbiota intestinal possa ter afinidade por esses organismos nominalmente associados ao solo (Liddicoat et al., 2020).

Clostridium bolteae é um membro normal da microbiota intestinal de humanos, sendo regularmente detetado em amostras fecais da maioria das crianças e de outros hospedeiros afetados por sintomas gastrointestinais e, principalmente, autismo (Cai et al., 2020).

Existem evidências de que *C. bolteae* está presente nas fezes da maioria das crianças, e numa concentração significativamente maior em crianças com autismo, do que naquelas que não apresentam a patologia (Pequegnat & Monteiro, 2019). Os estudos apontam para a possibilidade de que esta espécie **comprometa o funcionamento intestinal** através da produção de metabolitos neurotóxicos na chamada conexão intestino-cérebro. Esta bactéria intestinal excreta SCFAs, que têm capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e, portanto, acredita-se que atuem como neurotoxinas instigando sintomas semelhantes aos do autismo, especialmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento cerebral; sabe-se que produz também uma cápsula de polissacáridos imunogénicos específicos que se pensa poder ser útil para a criação de ferramentas diagnósticas não evasivas, com o objetivo de avaliar a frequência e o papel deste microrganismo em indivíduos autistas, e para a criação de uma vacina, de forma a reduzir os níveis de colonização no TGI, impedindo assim a concentração de neurotoxinas (Song et al., 2003; S. M. Finegold et al., 2005; Pequegnat & Monteiro, 2019).

Para além da associação ao autismo, *C. bolteae* pode causar **infecções intra-abdominais** quando a barreira intestinal natural é alterada. Por exemplo, uma

sobreabundância deste microrganismo é frequentemente associada a **episódios diarreicos crônicos**, à alteração da motilidade e da taxa de contração do TGI (Dehoux et al., 2016).

O significativo impacto económico e científico dos membros do género *Lactobacillus*, geralmente considerados não patogénicos, inclui muitas estirpes frequentemente usadas como **probióticos** e outras comercializadas como cosméticos, aplicações industriais e agrícolas, suplementos farmacêuticos ou mesmo dispositivos médicos (Campedelli et al., 2019). As funções das espécies deste género bacteriano incluem a homeostase imunológica, produção de nutrientes e vitaminas essenciais, e até mesmo como uma barreira física contra a infeção, uma vez que protegem o hospedeiro da colonização de organismos potencialmente patogénicos, produzindo ácidos lácticos que acidificam o ambiente (H. Kim et al., 2020); por este motivo, têm sido muito estudadas em investigações relativas a patologias como diarreia, intolerância à lactose, alergias, infeções, redução do colesterol, eczema e função imunológica. Algumas das espécies de *Lactobacillus* têm **atividades redutoras de aflatoxinas**. Liew et al. (2019) revelaram que 2×10^{10} UFC/mL de *Lactobacillus* spp. têm capacidade de reduzir o nível de AFB1 de 0,1 a 13%. Os autores sugerem que os componentes da superfície das bactérias probióticas estão envolvidos na adesão física direta a esta micotoxina, e por isso, a intervenção probiótica com estes microrganismos, é potencializada para minimizar a toxicidade induzida pela micotoxina (Liew et al., 2019). Os **benefícios fisiológicos associados a este género no intestino** incluem **(i)** o fortalecimento dos complexos de junção epitelial; **(ii)** o aumento do estado antioxidante; **(iii)** a diminuição de citocinas pró-inflamatórias; **(iv)** o aumento da libertação de citocinas anti-inflamatórias e **(v)** a modulação das células T reguladoras e macrófagos (Singh et al., 2018).

Particularmente, as estirpes da espécie bacteriana *Lactobacillus johnsonii* contêm proteínas de superfície especializadas, envolvidas na ligação da mucina, nomeadamente os ácidos lipoteicóicos e exopolissacáridos de natureza não proteica, que permitem que essas bactérias se fixem na superfície da mucosa intestinal, sendo os potenciais responsáveis pela sua persistência nesse ambiente (Rodríguez-Díaz & Monedero, 2013).

Xin et al. (2020) demonstraram que *L. johnsonii* BS15 alterou os subconjuntos de células T, aumentando significativamente a percentagem de células T CD3⁺CD4⁺ (linfócitos T *helper*) e a razão CD3⁺ CD4⁺/CD3⁺ CD8⁺ e diminuindo a percentagem de células T CD3⁺ CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) num modelo animal suíno. As mudanças nos níveis de células T são alguns dos indicadores mais importantes do nível de imunidade geral, bem como a sIgA fecal, cujos níveis também foram melhorados por *L. johnsonii*. Além disso, **exerceu efeitos benéficos sobre a microbiota fecal**, nomeadamente, aumentou de forma acentuada as populações bacterianas pertencentes aos géneros *Clostridium*, *Peptococcus* e *Lactobacillus* e reduziu as populações de *Escherichia coli*. Promoveu igualmente um aumento de peso médio diário nos animais, controlando a diarreia. Esses resultados sugerem que a suplementação com este microrganismo pode ser importante na **inibição de bactérias nocivas e no equilíbrio da microbiota intestinal** e indicam que o mesmo pode ser aplicado como um probiótico que promove o crescimento e controla a diarreia nos animais em estudo (Xin et al., 2020).

Liu et al. (2015) provaram que *L. johnsonii* JCM 2012^T **tem capacidade de manutenção da função da barreira intestinal**, em parte, **inibindo diretamente a fixação da *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC)**, uma causa importante de diarreia grave em leitões e vitelos jovens. A ETEC fixa-se às células do epitélio do intestino delgado (IECs), conduz à produção de enterotoxinas que facilitam a colonização de outros microrganismos patogénicos, bem como à interrupção da estrutura das TJ da mucosa e isso conduz, conseqüentemente, ao aumento da permeabilidade do intestino. Neste estudo, *L. johnsonii* aumentou a expressão da *heat shock protein 27* em células epiteliais do intestino delgado suíno (IPEC-J2), o que sugere que a mucosa possa estabelecer uma estratégia para preparar e reagir a vários estímulos imediatamente após o seu contacto com as IECs, e, portanto, reagir de forma diferente à ligação da *E. coli*. Em conjunto com todas as evidências descritas na fonte bibliográfica, o estudo comprovou que *L. johnsonii* teve capacidade de interagir diretamente com ETEC e reduzir o seu efeito prejudicial nas células IPEC-J2, destacando o seu potencial papel como probiótico; o mecanismo por trás desse efeito protetor ainda não está completamente definido, mas pensa-se ser dependente da capacidade de modular a

expressão das *heat shock protein*, das proteínas das TJ, ou ainda de restringir a adesão de microrganismos patogénicos (H. Y. Liu et al., 2015).

Ainda sobre o efeito protetor deste microrganismo na invasão por outros, He et al. (2019) demonstraram que, a administração oral de *L. johnsonii* L531 a leitões, **diminuiu significativamente os níveis de colonização da *Salmonella enterica* serovar Infantis CAU1508** no cólon e no jejuno, acelerou a eliminação nas fezes após a infecção e reduziu a sua translocação para o baço. O butirato e propionato produzidos por *L. johnsonii* regulam negativamente a expressão de genes de virulência bacteriana, como *hilA* e *invF*, que são ativadores transcricionais importantes na *Salmonella*. Por isso, nesse estudo, foi comprovado que o pré-tratamento dos leitões com esta estirpe probiótica pode ter um impacto positivo na manutenção da homeostase metabólica intestinal destes animais, sobretudo no período de desmame, com o controlo da infeção pela *Salmonella*, em grande parte pela manutenção dos níveis de SCFAs, no ceco e cólon (He et al., 2019). Para além disso, também demonstrou ter **atividade antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni***, tendo capacidade de reduzir a apoptose colónica induzida por esse microrganismo e a secreção intestinal, extraintestinal e sistémica de mediadores pró-inflamatórios (como IL-6, MCP-1, TNF e óxido nítrico) libertados pelo *C. jejuni* no intestino de ratos (Bereswill et al., 2017).

Por outro lado, quando Lim et al. (2017) isolaram *L. johnsonii* CJLJ103, da microbiota fecal humana, demonstraram que **esta estirpe atenua a colite** (induzida por TNBS) e o comprometimento da memória em ratos com apenas 6 semanas de idade, através: **(i)** de um aumento da expressão de proteínas das TJ (*zónula occludens-1*, *occludina* e *claudina-1*); **(ii)** do aumento da IL-10 e diminuição da IL-6; **(iii)** da capacidade de reduzir significativamente o crescimento da *E. coli*, bem como a sua produção de LPS para o sangue, **melhorando o ambiente do trato gastrointestinal** e contribuindo para a regulação negativa das respostas inflamatórias sistémicas; **(iv)** da inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) no hipocampo e da indução da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Spehlmann & Eckmann, 2009; S. M. Lim et al., 2017). Deste modo, os resultados do estudo sugeriram que essa estirpe melhora de forma significativa os parâmetros inflamatórios

envolvidos na colite e que ainda pode mitigar o comprometimento da memória nos modelos animais em estudo.

Relativamente à conhecida capacidade das estirpes específicas dos *Lactobacillus* spp. se ligarem a contaminantes alimentares, *L. johnsonii* CSCC 5142 **demonstrou ter capacidade de ligação à AFB1** de 30,1% numa solução contaminada com 5 µg/mL da micotoxina (Peltonen et al., 2001).

Deste modo, segundo as evidências da literatura bibliográfica, esta é certamente uma **potencial espécie probiótica benéfica**, útil para combater e/ou prevenir infeções enteropatogénicas com sucesso, controlando o ambiente intestinal e promovendo a sua homeostase; no entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor os mecanismos subjacentes.

Um componente chave de um microbioma intestinal completo e diverso, *Lactobacillus murinus* representa uma bactéria intestinal comensal naturalmente encontrada no intestino de mamíferos saudáveis; como é uma espécie que raramente é isolada de ambientes fora do intestino, é considerada autóctone, podendo associar-se intimamente com o epitélio da mucosa e, assim, translocar-se através dela (Ma et al., 1990; Lebovitz & Theus, 2019). Coloniza o TGI de roedores nos primeiros dias após o nascimento e permanece em elevados níveis populacionais ao longo da vida do roedor, no entanto, em comparação com outros *Lactobacillus* spp., é uma espécie relativamente pouco estudada que só recentemente foi considerado como um **potencial probiótico**, incluindo aplicações relacionadas à enterocolite necrosante (ECN) neonatal, produção de antimicrobianos, antagonismo de microrganismos patogénicos na função de barreira intestinal, alergia alimentar, diabetes tipo I, hipertensão associada à idade, inflamação e translocação bacteriana (Ma et al., 1990; Lebovitz & Theus, 2019).

Por exemplo, Isani et al. (2018) sugeriram que não só *L. murinus* HF12 tem capacidade de colonizar o intestino de ratos recém-nascidos de forma eficiente, como a sua inoculação precoce nestes animais constituiu **efeitos protetores significativos contra a ECN neonatal**. Esta patologia caracteriza-se por uma inflamação intestinal grave nos bebés, sendo, ainda

hoje, uma das principais causas de morbidade e mortalidade neonatal. Esta espécie bacteriana reduziu marcadores moleculares associados à ECN, nomeadamente: **(i)** atenuou o recrutamento da mieloperoxidase no intestino, uma proteína lisossomal exclusiva dos neutrófilos e monócitos, cujo recrutamento para o intestino é característico da doença, uma vez que, ao ser libertada do fagossoma daquelas células, conduz à formação de ROS e citocinas inflamatórias; **(ii)** anulou completamente a ativação da caspase-1 intestinal, um enzima intracelular específico conhecido por induzir a libertação da IL-1 β , na sua forma bioativa, no intestino; **(iii)** minimizou os níveis dos mRNAs que codificam para a ciclo-oxigenase-2, um enzima considerado um dos principais marcadores da inflamação intestinal, frequentemente induzida no epitélio intestinal de pacientes com DIIs; **(iv)** reduziu significativamente a translocação do *Cronobacter muytjensii* - um microrganismo oportunista associado à NEC clínica e meningite neonatal - do lúmen intestinal para o baço (Isani et al., 2018). Desta forma, os autores sugerem que a introdução artificial de bactérias benéficas é clinicamente relevante e é um passo crucial no desenvolvimento de proteção contra esta patologia.

L. murinus pode, por outro lado, ser uma espécie probiótica que possui **atividades anti-alérgicas e imunomoduladoras**. Huang et al. (2016) administraram oralmente 10⁹ UFC deste microrganismo num modelo murino macho BALB/c (com 4 a 5 semanas de idade), com alergia alimentar, e demonstraram que, em primeiro lugar, houve um aumento significativo da densidade de *Lactobacillus* spp. e uma redução de microrganismos não específicos nos ratos alérgicos, ou seja, esta espécie teve capacidade de melhorar o perfil da microbiota intestinal destes animais; em segundo lugar, ocorreu uma atenuação significativa das respostas alérgicas pela diminuição da infiltração e desgranulação de mastócitos, e igualmente por uma redução na produção de IgE (C. H. Huang et al., 2016).

Relativamente aos mecanismos imunológicos que *L. murinus* utiliza como efeito antialérgico foi destacada a sua capacidade de promover um imunoequilíbrio na resposta Th1/Th2 associadas à alergia alimentar. A administração deste microrganismo aumentou a produção de IFN- γ (uma citocina Th1 que regula negativamente a produção de IgE) e diminuiu a produção de IL-4 (uma citocina Th2 que regula positivamente a produção de IgE). Para além

disso, também aumentou os níveis de IL-12, expressa por células apresentadoras de antígeno, e que regula positivamente a diferenciação de células Th1. Assim, uma vez que as respostas alérgicas induzidas por proteínas alimentares são ditadas principalmente por estas citocinas derivadas de células T auxiliares, significa que a mudança do equilíbrio imunológico na direção Th2 para Th1, provocada por *L. murinus*, pode ser uma estratégia para reduzir os efeitos associados à alergia alimentar (C. H. Huang et al., 2016).

Curiosamente, também Pan et al. (2018) demonstraram que *L. murinus* CR147 teve a capacidade de **prolongar a vida útil num modelo animal murino**, uma vez que: (i) regulou negativamente a interleucina-8 (IL-8) produzida por células do adenocarcinoma colorretal humano estimuladas pelo TNF- α ; (ii) melhorou a função de barreira intestinal; (iii) reduziu marcadores inflamatórios sistêmicos e (iv) contribuiu para a imuno homeostasia intestinal do hospedeiro pela supressão de células T auxiliares pró-inflamatórias na mucosa intestinal (Pan et al., 2018). Este microrganismo pode colonizar o TGI superior de forma semelhante a um biofilme, possivelmente atuando como uma barreira de defesa contra a colonização por outras bactérias; estes biofilmes são muito úteis para a manutenção do ciclo de vida da população bacteriana, bem como da sua resistência, por exemplo, aos antibióticos (Almirón et al., 2013).

Para além disto, *L. murinus* isolado de um modelo animal de borrego, revelou ter **capacidade antifúngica** a pH 4, uma vez que inibiu o crescimento das espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* em 25,3 e 32,6 %, respetivamente, quando cultivados em meio Sabouraud (Drobná et al., 2017).

É importante mencionar que só foram descritas anteriormente as espécies bacterianas que pareceram relevantes a nível bibliográfico, cuja abundância relativa era notória e cuja literatura indicava uma influência interessante a nível intestinal, de forma a ir de encontro ao objetivo do presente trabalho. Assim, com base na literatura bibliográfica e na abundância relativa dos microrganismos, que foram identificadas apenas com a plataforma de sequenciação de terceira geração, podem observar-se duas espécies (*Kineothrix alysoides* e *Clostridium bolteae*) que, provavelmente, não são influenciadas pela AFB1, pois a sua abundância nos ratinhos descendentes não é afetada pela exposição materna a esse contaminante alimentar; e outros dois probióticos, *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus*

johnsonii, cujo aumento da abundância com a exposição à AFB1 não parece ser preocupante na saúde intestinal dos ratinhos, uma vez que demonstram ser microrganismos que conferem benefícios a vários níveis e, portanto, cujo aumento pode ser até vantajoso.

Claramente que se observam algumas diferenças entre os resultados obtidos através das duas plataformas de sequenciação utilizadas, MinION™ e Illumina Miseq, particularmente por se verificar um número significativo de espécies bacterianas adicionais que foram identificadas pela plataforma de terceira geração e não pela de segunda. Estas diferenças devem-se provavelmente às características e limitações entre os dois métodos de sequenciação utilizados, que constam na Tabela 13.

Uma característica particular do **MinION™** é o facto de o processo de sequenciação não utilizar um sinal secundário (como luz ou pH) nem necessitar de amplificação do DNA antes da sequenciação, como acontece com o **Illumina Miseq**. Para além disso, a sequenciação de 3ª geração utiliza nanoporos para sequenciar uma única molécula de DNA por poro, o que confere vantagens potenciais significativas comparativamente à sequenciação de 2ª geração, que dependem de grupos de moléculas de DNA amplificadas (Laver et al., 2015). De acordo com a literatura, as células de fluxo utilizadas pelo MinION™ fornecem uma precisão de ~ 95% com uma saída de ~ 20 GB; porém, a qualidade das leituras geradas ainda é inferior às da Illumina, que possuem uma precisão de 99,9%. Outra característica relevante das plataformas ONT é que a análise de dados pode ser realizada desde o início da execução da sequenciação, uma vez que as leituras são realizadas em tempo real, o que pode reduzir consideravelmente o tempo de análise em comparação com as plataformas Illumina Miseq. Além disso, os custos associados às análises realizadas pelo MinION™ são muito menores em comparação com outras plataformas de sequenciação atualmente aplicadas para estudos metagenómicos 16S rRNA (Santos et al., 2020).

Por outro lado, com o MinION™ existe a possibilidade de se obterem leituras mais longas permitindo cobrir a sequência completa do gene 16S rRNA (regiões V1-V9), enquanto que, com a plataforma Illumina, a estratégia convencional para sequenciar o 16S rRNA usa frequentemente as regiões hipervariáveis V1-V2 e/ou V3-V4, e a taxonomia é atribuída com base apenas nessas curtas regiões variáveis do gene 16S rRNA, de aproximadamente 300 pb.

A análise dessas regiões curtas fornece uma resolução taxonômica limitada (e que vai variar com a escolha de diferentes porções do gene 16S rRNA) na maioria dos casos, não conseguindo discriminar eficazmente sequências de forma confiável que vão além do nível do gênero. Assim, é provável que a plataforma de sequenciação de terceira geração tenha maior potencial para fazer a discriminação entre taxas, fornecer um sinal filogenético mais profundo e um posicionamento taxonômico mais preciso de sequências 16S rRNA (Santos et al., 2020). Santos et al. (2020) sugerem que, em comparação com o Illumina Miseq, existem menos ferramentas e protocolos de bioinformática projetados especificamente para a análise de sequências Nanopore 16S; para além disso, destaca que algumas particularidades - como filtros de qualidade e cobertura das sequências - já estão configuradas de forma padrão, por isso, o usuário não pode alterar mais do que os parâmetros iniciais da qualidade das leituras (Santos et al., 2020).

Tabela 13: Comparação das plataformas de sequenciação para análise metagenômica 16S (adaptado de Santos et al., 2020)

Plataforma de sequenciação	Comp. da leitura (pb)	Precisão (%)	Sequenciação	Tempo (h)	Vantagens
Illumina Miseq	75-300	99,9	Sequenciação por síntese	21 - 56	Elevado rendimento e elevada qualidade das leituras
MinION™	> 200	≈ 95	Sequenciação em tempo real	1 - 48	Elevado rendimento, comprimentos de leitura longos e portabilidade

5. Conclusão

O intestino é, sem dúvida, o elo principal entre as micotoxinas ingeridas e os efeitos prejudiciais nos humanos e animais. Claramente, os efeitos negativos das micotoxinas - descritas como “produtos naturais produzidos por fungos que evocam uma resposta tóxica quando introduzidos em baixa concentração nos animais” (Jin et al., 2021) - no intestino e no sistema imunológico evidenciam que elas podem desempenhar um papel crítico na iniciação, progressão e duração das infeções intestinais. Esses efeitos incluem, entre outros, a diminuição da viabilidade celular, reduções nas concentrações de SCFAs e eliminação de bactérias benéficas, expressão aumentada de genes e citocinas envolvidos na progressão da inflamação e diminuição da proliferação celular, o que reduz, consequentemente, a capacidade do intestino de reparação de si mesmo (Broom, 2015).

O estudo do microbioma intestinal tem vindo a transformar o panorama científico, conforme se verifica pelo aumento exponencial de publicações relacionadas a esse tema, de muitas áreas multidisciplinares diferentes (Fricker et al., 2019). Portanto, para investigar a relação entre o hospedeiro e a microbiota, vários métodos têm sido empregues para a deteção da composição da comunidade microbiana, a partir de amostras naturais e clínicas (Shin et al., 2016).

Em particular, neste trabalho, a composição da microbiota intestinal foi compreendida utilizando uma abordagem metagenómica filogenética e métodos de sequenciação massiva de *amplicons* do gene 16S rRNA através das plataformas MiniON Oxford Nanopore e Illumina Miseq. Para analisar os resultados obtidos foi determinada, em primeiro lugar, a abundância relativa (%) das espécies bacterianas e, posteriormente, foi calculado o índice de diversidade de Shannon, para inferir da hetero ou homogeneidade microbiana das ninhadas; foi feito o tratamento estatístico ANOVA para compreender se existiam diferenças estatisticamente significativas ao nível do género e da espécie, e, por fim, foi determinado o *core microbiome*, de maneira a detetar microrganismos que se destacam e que são particularmente importantes no microbioma do hospedeiro, associados apenas às ninhadas

controle, ou presentes exclusivamente nos ratinhos cuja mãe sofreu exposição ao contaminante alimentar.

Como se sabe, a gravidez é caracterizada por muitas alterações na resposta imune a fim de tolerar o feto semialogénico, e a presença da microbiota é, sem dúvida, primordial em algumas dessas adaptações da resposta imune materna à gravidez (Faas et al., 2020). Os recém-nascidos podem ser expostos a aflatoxinas no útero, uma vez que as toxinas passam da mãe para o feto através da placenta, e essa exposição pode continuar durante a amamentação, até à introdução de alimentos sólidos. As consequências dessa exposição para as mães, fetos e crianças são inúmeras, uma vez que existem vários **mecanismos potenciais que ligam a exposição à aflatoxina a resultados adversos na gravidez**, incluindo a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias e/ou regulação negativa de citocinas anti-inflamatórias; indução de enteropatia caracterizada por inflamação intestinal e comprometimento da função de barreira, levando à ativação imune sistémica; potenciais efeitos tóxicos nos órgãos maternos, causando ativação imunológica sistémica e comprometimento do desenvolvimento placentário e fetal; e, conseqüentemente, também efeitos tóxicos nos órgãos fetais, causando anomalias no seu desenvolvimento (Smith et al., 2017).

Sintetizando, neste trabalho, **a dinâmica microbiana provocada pela AFB1 gerou:**

- (i) a colonização de grupos de espécies bacterianas (como *Barnesiella intestinihominis*, *Muribaculum intestinale*, *Clostridium lactatifermentans*, *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus johnsonii*), cuja abundância relativa foi aumentada pela AFB1, mas que, provavelmente, **não provocam efeitos negativos no microbioma**, uma vez que constituem mecanismos protetores da barreira intestinal, podem ser utilizados como probióticos e promovem a redução da colonização por outras bactérias patogénicas;
- (ii) o **aumento significativo de espécies bacterianas com potencialidade inflamatória intestinal**, constituindo efeitos prejudiciais ao nível do intestino fetal, como *Dorea longicatena*, uma bactéria intestinal humana não benéfica, que promove o aumento da permeabilidade intestinal, associada à doença de Crohn e ao

síndrome do intestino irritável e *Staphylococcus lentus*, que apesar de ser considerado flora alimentar benéfica e um colonizador crucial até à terceira semana de vida, também é uma causa de infecções humanas e animais, devido aos diversos fatores de virulência que possui e à grande probabilidade de causar intoxicações alimentares em indivíduos imunocomprometidos;

(iii) um **grupo de bactérias benéficas intestinais**, cuja colonização nos ratinhos descendentes foi significativamente reduzida pela exposição materna à AFB1, o que mostra ser preocupante a nível intestinal, uma vez que se reduzem espécies cruciais à homeostase, com capacidade reparadora e anti-inflamatória; nomeadamente *Akkermansia muciniphila*, a principal espécie que degrada o muco intestinal, que regula a sua espessura e que promove a integridade da barreira intestinal, sendo fundamental na maturação do sistema imunológico e no estabelecimento da microbiota do bebé; *Parabacteroides distasonis*, um probiótico promissor, com forte potencial anti-inflamatório e de restauração da barreira epitelial, principalmente pela produção de succinato e pela diminuição da severidade da inflamação intestinal em ratos; e *Faecalibaculum rodentium*, que tem uma elevada capacidade de produção de butirato intestinal e propriedades anti tumorigénicas interessantes.

(iv) um conjunto de **espécies bacterianas que foram resistentes à exposição à aflatoxina**, ou seja, cuja abundância relativa foi muito semelhante nas ninhadas tratadas e nas ninhadas controlo, o que significa que a presença do contaminante alimentar materno não afetou negativamente a colonização destes microrganismos nos ratinhos descendentes, nomeadamente *Bacteroides acidifaciens*, dominante no microbioma infantil e adulto, participa no metabolismo de lípidos e glúcidos e ativa algumas citocinas e recetores de células imunes; *Kineothrix alysoides*, um importante produtor de butirato intestinal e *Clostridium bolteae*.

A análise do *core microbiome* permitiu a identificação de três espécies particularmente notáveis segundo a literatura, encontradas somente nas ninhadas expostas à AFB1 e que têm uma enorme **potencialidade inflamatória no microambiente intestinal fetal**,

nomeadamente, *Desulfovibrio piger*, *Bilophila wadsworthia* e *Bacteroides thetaiotaomicron*. As duas primeiras são espécies bacterianas redutoras de sulfato, cuja principal função prejudicial para o intestino se prende com a formação de sulfureto de hidrogénio e na inibição da oxidação do butirato - a fonte de energia preferencial para os colonócitos; *B. thetaiotaomicron* que pode contribuir para a inflamação do intestino através da sua atividade sialidase e sulfatase, bem como contribuir para a progressão da inflamação mediada por microrganismos entéricos, mais especificamente, *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Citrobacter rodentium*.

Exclusivamente nas ninhadas controlo foi identificada uma espécie totalmente inofensiva, probiótica e sem qualquer potencial de causar inflamação, *Bacteroides xylanisolvens*; *Anaerostipes caccae*, essencial para produzir butirato e para estabelecer relações de simbiose com outros microrganismos, de maneira a promover a saúde intestinal; *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Peptococcus niger*, que tanto podem ter funções benéficas no hospedeiro, como provocar síndrome diarreica e emética, inibição e supressão da imunidade e contribuir para o metabolismo das bactérias sulfidogénicas intestinais, respetivamente.

Desta forma, de acordo com o padrão do microbioma animal infantil identificado nas ninhadas estudadas, verificam-se algumas alterações significativas a nível intestinal e **comprova-se que podem existir possíveis consequências graves da exposição materna precoce à AFB1 no microbioma do feto**, o que provavelmente se traduzirá no aparecimento de diversas patologias mais tarde na vida, como a obesidade, diabetes, alergias alimentares, imunodeficiências etc., mas, essencialmente, doenças inflamatórias intestinais. A alteração do microbioma do intestino induzida por esta micotoxina - nomeadamente o aumento de espécies potencialmente patogénicas e redução da abundância de espécies promotoras da homeostase intestinal - conduz principalmente: **(i)** ao aumento da permeabilidade intestinal, e, conseqüentemente, comprometimento da integridade da barreira com a entrada indesejada de microrganismos patogénicos e xenobióticos; **(ii)** à apoptose celular bem como suscetibilidade a infeções entéricas; **(iii)** ao aumento da expressão de genes envolvidos na promoção da inflamação e invasão de microrganismos indesejáveis; **(iv)** à diminuição da

capacidade de reparação intestinal; (v) à redução da produção de SCFAs e da viabilidade celular; (vi) à diminuição da produção de muco; (vii) ao aumento da probabilidade de surgirem patologias graves mais tarde na vida, sobretudo DIIs e alergias alimentares (Broom, 2015).

Relativamente às possíveis **consequências ao nível do sistema imunológico**, a imunossupressão causada pela AFB1 tem sido demonstrada, desde 1960, em várias espécies pecuárias e também em animais utilizados para fins experimentais, sendo considerado um dos agentes imunotóxicos mais estudados (Jolly et al., 2008). Na presente investigação, a exposição materna à micotoxina pode ter tido, de facto, impacto negativo no sistema imunológico intestinal dos ratinhos descendentes, particularmente, por ter provocado: (i) a diminuição de espécies bacterianas que promovem tolerância e maturação imunológica no intestino dos ratos e que aumentam a produção de imunoglobulinas cruciais para as respostas imunes do hospedeiro; (ii) diminuição de espécies bacterianas que tinham potencial anti tumoral, mas também o aumento de outras com possíveis papéis carcinogénicos intestinais, o que pode facilmente comprometer o bom funcionamento do sistema imunológico; (iii) o aumento de microrganismos que estimulam a resposta imune por libertação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- γ , TNF- α etc.), diminuindo igualmente a autoimunidade das células imunes do lúmen intestinal; (iv) a redução da produção de citocinas anti inflamatórias, como a IL-10, pela microbiota; (v) diminuição de espécies com atividade imunomoduladora, que estimulam mecanismos imunes adaptativos, contribuem para atenuar a inflamação e estabilizam a composição da microbiota intestinal.

Mesmo com todas as limitações que cabe a cada uma das plataformas de sequenciação massiva utilizadas, estas permitiram a determinação rápida, precisa e eficiente da diversidade microbiana ao nível do filo, género e espécie, conforme demonstrado pelo sucesso na determinação da composição do microbioma das fezes de ratinho.

No entanto, atualmente, identificar a causalidade do microbioma humano é desafiador e estudado, em grande parte, através de modelos animais, por isso, é necessário cautela ao “extrapolar” todos os resultados obtidos em ratinhos para os seres humanos, uma vez que os estudos já realizados indicam que, apesar de haver semelhanças, o microbioma dos ratos e

dos humanos compartilham apenas uma pequena fração de informações metagenômicas comuns (Tierney et al., 2020); portanto, continuam a ser indispensáveis mais estudos para comprovar todas as conclusões que nos sugerem os resultados desta investigação, principalmente em humanos. Para além disso, fatores como a idade dos animais e a dose de micotoxina administrada também influenciam o estudo e, igualmente, embora as fezes sejam amostras fáceis de recolher, os resultados obtidos da sua análise nem sempre são representativos dos efeitos que ocorrem nos diferentes segmentos do intestino (Guerre, 2020).

Creio que, hoje em dia, o estudo do microbioma intestinal é tão ou mais importante que, por exemplo, o estudo da história familiar genética na discriminação de doenças complexas humanas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais; e porque os microrganismos que residem no nosso microbioma intestinal podem, na realidade, funcionar como “preditores” dessas doenças crônicas, é imprescindível, futuramente, que sejam incentivadas, com frequência, as análises fecais precoces, tanto da mãe como do bebé - quer durante a gravidez ou no pós-parto - de forma a ser detetada qualquer alteração que possa prever patologias intestinais (Tierney et al., 2020).

São ainda necessários muitos estudos para compreender o impacto real que a interação precoce das micotoxinas com o microbioma intestinal na gravidez pode ter na vida do feto, e inclusive ainda são bastante limitados os dados sobre os efeitos imunotóxicos das aflatoxinas em humanos que são cronicamente expostos a ela na dieta, no entanto, espero que esta investigação tenha constituído uma mais valia na compreensão desta temática e que possa abrir caminho para novas investigações e novas abordagens relativamente ao assunto.

6. Referências bibliográficas

- Abbeele, P., Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W. M., Thas, O., De Weirtdt, R., Kerckhof, F. M., & Van De Wiele, T. (2013). Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME Journal*, 7(5), 949–961. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.158>
- Abdel-Shafi, S., Shehata, S., Shindia, A., El-Meligy, K., & Khidr, A. (2018). Biodegradation of aflatoxins by bacteria. *Egyptian Journal of Microbiology*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejm.2018.5752.1078>
- Abdelkader, R., Abdelkhalek, H., Hammad, A., Youssef, K., & Abdou, D. (2020). Growth Inhibition of Aflatoxigenic Molds and Biodegradation of Aflatoxin B1 by Certain Bacterial Isolates. *Egyptian Journal of Microbiology*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejm.2020.37114.1166>
- Adeghate, J. O., Juhász, E., Iván, M., Pongrácz, J., & Kristóf, K. (2020). Similar Strains of Coagulase-Negative Staphylococci Found in the Gastrointestinal Tract and Bloodstream of Bacteremic Neonates. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3509676>
- Adegoke, A. A., Stenström, T. A., & Okoh, A. I. (2017). Stenotrophomonas maltophilia as an emerging ubiquitous pathogen: Looking beyond contemporary antibiotic therapy. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02276>
- Akbari, P., Braber, S., Varasteh, S., Alizadeh, A., Garssen, J., & Fink-Gremmels, J. (2017). The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1007–1029. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1794-8>
- Akinrinmade, F. J., Akinrinde, A. S., & Amid, A. (2016). Changes in serum cytokine levels, hepatic and intestinal morphology in aflatoxin B1-induced injury: modulatory roles of melatonin and flavonoid-rich fractions from Chromolaena odorata. *Mycotoxin Research*, 32(2), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0239-9>
- Aktar, R., Parkar, N., Stentz, R., Baumard, L., Parker, A., Goldson, A., Brion, A., Carding, S., Blackshaw, A., & Peiris, M. (2020). Human resident gut microbe Bacteroides thetaiotaomicron regulates colonic neuronal innervation and neurogenic function. *Gut Microbes*, 11(6), 1745–1757. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1766936>
- Al-Talib, N. A., Abduljala, M. H., & Hamodat, Z. M. A. (2020). A review on staphylococcus sp. And its pathogens. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 755–759. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i1.1888>
- Almirón, M., Traglia, G., Rubio, A., & Sanjuan, N. (2013). Colonization of the mouse upper gastrointestinal tract by lactobacillus murinus: A histological, immunocytochemical, and ultrastructural study. *Current Microbiology*, 67(4), 395–398.

<https://doi.org/10.1007/s00284-013-0367-9>

- Amirkhazadeh, Z., Starkweather, A. R., Henderson, W. A., Gyamfi, A., & Cong, X. S. (2020). Altered composition of gut microbiota in depression: A systematic review. *Frontiers in Psychiatry, 11*(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00541>
- An, S. qi, & Berg, G. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends in Microbiology, 26*(7), 637–638. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.006>
- Anal, A. K., Koirala, S., & Shrestha, S. (2021). Gut Microbiome and Their Possible Roles in Combating Mycotoxins. *Mycotoxins in Food and Beverages, April*, 213–235. <https://doi.org/10.1201/9781003176046-9>
- Andersson, M. A., Hakulinen, P., Honkalampi-Hämäläinen, U., Hoornstra, D., Lhuguenot, J. C., Mäki-Paakkanen, J., Savolainen, M., Severin, I., Stamatii, A. L., Turco, L., Weber, A., von Wright, A., Zucco, F., & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. *Toxicon, 49*(3), 351–367. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.10.006>
- Applied Biological Materials Inc. (2021). *Polymerase Chain Reaction - Introduction*. <https://info.abmgood.com/polymerase-chain-reaction-pcr-introduction>
- Ashrafian, F., Behrouzi, A., Shahriary, A., Badi, S. A., Davari, M., Khatami, S., Jamnani, F. R., Fateh, A., Vaziri, F., & Siadat, S. D. (2019). Comparative study of effect of *Akkermansia muciniphila* and its extracellular vesicles on toll-like receptors and tight junction. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench, 12*(2), 163–168. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v12i2.1537>
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine, 190*(7), 995–1003. <https://doi.org/10.1084/jem.190.7.995>
- Assunção, R., Vasco, E., Nunes, B., Loureiro, S., Martins, C., & Alvito, P. (2015). Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. *Food and Chemical Toxicology, 86*, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.017>
- Aujoulat, F., Roudière, L., Picaud, J. C., Jacquot, A., Filleron, A., Neveu, D., Baum, T. P., Marchandin, H., & Jumas-Bilak, E. (2014). Temporal dynamics of the very premature infant gut dominant microbiota. *BMC Microbiology, 14*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0325-0>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V., & Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host and Microbe, 12*(5), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>

- Baron, E. J. (1997). *Bilophila wadsworthia*: A unique gram-negative anaerobic rod. *Anaerobe*, 3(2–3), 83–86. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0075>
- Barton, L., Fardeau, M.-L., & Fauque, G. (2014). Hydrogen Sulfide: A Toxic Gas Produced by Dissimilatory Sulfate and Sulfur Reduction and Consumed by Microbial Oxidation. In *Metal Ions in Life Sciences* (Vols. 14–113, Issue November, pp. v–vi). <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9269-1>
- Baumler, A., & Sperandio, V. (2017). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nature18849>. Interactions
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Belzer, C., Chia, L. W., Aalvink, S., Chamlagain, B., Piironen, V., Knol, J., & de Vos, W. M. (2017). Microbial metabolic networks at the mucus layer lead to diet-independent butyrate and vitamin B12 production by intestinal symbionts. *MBio*, 8(5), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00770-17>
- Bereswill, S., Ekmekciu, I., Escher, U., Fiebiger, U., Stingl, K., & Heimesaat, M. M. (2017). *Lactobacillus johnsonii* ameliorates intestinal, extra-intestinal and systemic pro-inflammatory immune responses following murine *Campylobacter jejuni* infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02436-2>
- Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., & Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2570–2584. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2688-3>
- Bertinetto, C., Engel, J., & Jansen, J. (2020). ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*: X, 6, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2020.100061>
- Bio-Rad Laboratories. (2021). *ChemiDoc XRS+ System*. <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4>
- Bjursell, M. K., Martens, E. C., & Gordon, J. I. (2006). Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36269–36279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606509200>
- Blaak, E. E., Canfora, E. E., Theis, S., Frost, G., Groen, A. K., Mithieux, G., Nauta, A., Scott, K., Stahl, B., van Harsselaar, J., van Tol, R., Vaughan, E. E., & Verbeke, K. (2020). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Beneficial Microbes*, 11(5), 411–455. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
- Blachier, F., Davila, A. M., Mimoun, S., Benetti, P. H., Atanasiu, C., Andriamihaja, M., Benamouzig, R., Bouillaud, F., & Tomé, D. (2010). Luminal sulfide and large intestine

- mucosa: Friend or foe? *Amino Acids*, 39(2), 335–347. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0445-2>
- Blatter, A. (2018). *Choosing the Right Method for Nucleic Acid Quantitation*. Promega Corporation. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/choosing-the-right-method-for-nucleic-acid-quantitation/>
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
- Brahe, L. K., Le Chatelier, E., Prifti, E., Pons, N., Kennedy, S., Hansen, T., Pedersen, O., Astrup, A., Ehrlich, S. D., & Larsen, L. H. (2015). Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutrition and Diabetes*, 5(6), e159-7. <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.9>
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 2–41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Broom, L. (2015). Mycotoxins and the intestine. *Animal Nutrition*, 1(4), 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.11.001>
- Browne, P., Van der Waal, M., & Claassen, E. (2017). Infant and child microbiota: current status and directions for future research. In E. C. and M. D. C. Pamela D. Browne (Ed.), *Microbiota in health and disease: from pregnancy to childhood* (pp. 17–35). <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-839-1>
- Brugiroux, S., Beutler, M., Pfann, C., Garzetti, D., Ruscheweyh, H. J., Ring, D., Diehl, M., Herp, S., Lötscher, Y., Hussain, S., Bunk, B., Pukall, R., Huson, D. H., Münch, P. C., McHardy, A. C., McCoy, K. D., MacPherson, A. J., Loy, A., Clavel, T., ... Stecher, B. (2016). Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nature Microbiology*, 2(November). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.215>
- Caballero, M., & Mazili, S. (2020). *A complex battlefield: mycotoxins in the gastrointestinal tract*. <https://www.thepigsite.com/articles/a-complex-battlefield-mycotoxins-in-the-gastrointestinal-tract>
- Cai, J., Hu, J., Qin, C., Li, L., Shen, D., Tian, G., Zou, X., Seeberger, P. H., & Yin, J. (2020). Chemical Synthesis Elucidates the Key Antigenic Epitope of the Autism-Related Bacterium *Clostridium bolteae* Capsular Octadecasaccharide. *Angewandte Chemie - International Edition*, 59(46), 20529–20537. <https://doi.org/10.1002/anie.202007209>
- Caldeira, A. T., Schiavon, N., Mauran, G., Salvador, C., Rosado, T., Mirão, J., & Candeias, A. (2021). On the biodiversity and biodeteriogenic activity of microbial communities present in the hypogenic environment of the Escoural Cave, Alentejo, Portugal. *Coatings*, 11(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/coatings11020209>
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill,

- C., & O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), 1–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
- Canani, R. B., Costanzo, M. Di, Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 17(12), 1519–1528. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519>
- Cani, P. D., & de Vos, W. M. (2017). Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01765>
- Cao, H., Liu, D., Mo, X., Xie, C., & Yao, D. (2011). A fungal enzyme with the ability of aflatoxin B1 conversion: Purification and ESI-MS/MS identification. *Microbiological Research*, 166(6), 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.09.002>
- Carbonero, F., Benefiel, A. C., Alizadeh-Ghamsari, A. H., & Gaskins, H. R. (2012). Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Frontiers in Physiology*, 3 NOV(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00448>
- Catlett, J., Catazaro, J., Cashman, M., Carr, S., Powers, R., Cohen, M., & Buan, N. (2020). *Metabolic Feedback Inhibition Influences Metabolite Secretion by the Human Gut Symbiont Bacteroides thetaiotaomicron Jennie*. 5(5), 1–16.
- Cecchini, D. A., Laville, E., Laguerre, S., Robe, P., Leclerc, M., Doré, J., Henriessat, B., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., & Potocki-Véronèse, G. (2013). Functional Metagenomics Reveals Novel Pathways of Prebiotic Breakdown by Human Gut Bacteria. *PLoS ONE*, 8(9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072766>
- Chang, D. H., Rhee, M. S., Ahn, S., Bang, B. H., Oh, J. E., Lee, H. K., & Kim, B. C. (2015). *Faecalibaculum rodentium* gen. nov., sp. nov., isolated from the faeces of a laboratory mouse. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(6), 1309–1318. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0583-3>
- Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P. A., & Bernalier-Donadille, A. (2008). *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylandegrading bacterium isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 1008–1013. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65504-0>
- Chen, Y. R., Zhou, L. Z., Fang, S. T., Long, H. Y., Chen, J. Y., & Zhang, G. X. (2019). Isolation of *Desulfovibrio* spp. from human gut microbiota using a next-generation sequencing directed culture method. *Letters in Applied Microbiology*, 68(6), 553–561. <https://doi.org/10.1111/lam.13149>
- Chia, L., Mank, M., Blijenberg, B., Aalvink, S., Bongers, R. S., Stahl, B., Knol, J., & Belzer, C. (2020). *Bacteroides thetaiotaomicron* fosters the growth of butyrate-producing anaerostipes caccae in the presence of lactose and total human milk carbohydrates.

Microorganisms, 8(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101513>

- Chia, L., Mank, M., Blikenberg, B., Bongers, R., Aalvink, S., Limpt, K., & Wopereis, H. (2018, June 18). *Cross-feeding between Bifidobacterium infantis and Anaerostipes caccae on lactose and human milk oligosaccharides*.
- Chia, L. W., Hornung, B. V. H., Aalvink, S., Schaap, P. J., de Vos, W. M., Knol, J., & Belzer, C. (2018). Deciphering the trophic interaction between Akkermansia muciniphila and the butyrogenic gut commensal Anaerostipes caccae using a metatranscriptomic approach. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(6), 859–873. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1040-x>
- Chulze. (2010, March 26). *Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review*.
- Comstock, L. E. (2009). Importance of Glycans to the Host-Bacteroides Mutualism in the Mammalian Intestine. *Cell Host and Microbe*, 5(6), 522–526. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.010>
- Coppa, C., Khaneghah, A., Alvito, P., Assunção, R., Martins, C., Eş, I., Gonçalves, B. L., Valganon de Neeff, D., Sant’Ana, A. S., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2019). The occurrence of mycotoxins in breast milk, fruit products and cereal-based infant formula: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 92(March), 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.014>
- Corporation, P. (2021). *QuantiFluor® dsDNA System*. <https://worldwide.promega.com/products/rna-analysis/dna-and-rna-quantitation/quantifluor-dsdna-system/?catNum=E2670>
- Cuffaro, B., Assouhoun, A. L. W., Boutillier, D., Súkeníková, L., Desramaut, J., Boudebouze, S., Salomé-Desnoulez, S., Hrdý, J., Waligora-Dupriet, A. J., Maguin, E., & Grangette, C. (2020). In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/cells9092104>
- Curtis, M., Hu, Z., Sanjeev, N., Deberardinis, R., & Sperandio, V. (2015, December 10). *The gut commensal Bacteroides thetaiotaomicron exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape*. 16(6), 759–769. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.005>.The
- D’Elia, J. N., & Salyers, A. A. (1996). Effect of regulatory protein levels on utilization of starch by Bacteroides thetaiotaomicron. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7180–7186. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7180-7186.1996>
- Dahmus, J. D., Kotler, D. L., Kastenbergh, D. M., & Kistler, C. A. (2018). The gut microbiome and colorectal cancer: A review of bacterial pathogenesis. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(4), 769–777. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.04.07>
- Daliri, E. B. M., Tango, C. N., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2018). Human microbiome

- restoration and safety. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(5), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.002>
- Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Kayser, B. D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., Dumas, M. E., Rizkalla, S. W., Doré, J., Cani, P. D., Clément, K., Le Mouhaër, S., Cotillard, A., Kennedy, S. P., Pons, N., ... Lepage, P. (2016). Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426–436. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778>
- De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., & De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 766, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.003>
- Dehoux, P., Marvaud, J. C., Abouelleil, A., Earl, A. M., Lambert, T., & Dauga, C. (2016). Comparative genomics of Clostridium bolteae and Clostridium clostridioforme reveals species-specific genomic properties and numerous putative antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3152-x>
- Derrien, M., & Vlieg, J. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 23(6), 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>
- Despres, J. (2016). Unraveling the pectinolytic function of Bacteroides xylanisolvens using a RNA-seq approach and mutagenesis. *BMC Genomics*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2472-1>
- Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Chambon, C., Yeoman, C. J., Berg Miller, M. E., Fields, C. J., Martens, E., Terrapon, N., Henrissat, B., White, B. A., & Mosoni, P. (2016). Xylan degradation by the human gut Bacteroides xylanisolvens XB1AT involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. *BMC Genomics*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2680-8>
- Devkota, S., & Chang, E. B. (2015). Interactions between diet, bile acid metabolism, gut microbiota, and inflammatory bowel diseases. *Digestive Diseases*, 33(3), 351–356. <https://doi.org/10.1159/000371687>
- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M. W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D. A., Jabri, B., & Chang, E. B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. *Nature*, 487(7405), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature11225>
- Dias, L., Rosado, T., Candeias, A., Mirão, J., & Caldeira, A. T. (2020). A change in composition, a change in colour: The case of limestone sculptures from the Portuguese National Museum of Ancient Art. *Journal of Cultural Heritage*, 42, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.07.025>
- Dobranowski, P. A., Tang, C., Sauvé, J. P., Menzies, S. C., & Sly, L. M. (2019).

- Compositional changes to the ileal microbiome precede the onset of spontaneous ileitis in SHIP deficient mice. *Gut Microbes*, 10(5), 578–598. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1560767>
- Dolan, K. T., & Chang, E. B. (2017). Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600129>
- Dordević, D., Jančíková, S., Vítězová, M., & Kushkevych, I. (2021). Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. *Journal of Advanced Research*, 27, 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.003>
- Dowden, R. A., McGuinness, L. R., Wisniewski, P. J., Campbell, S. C., Guers, J. J., Oydanich, M., Vatner, S. F., Häggblom, M. M., & Kerkhof, L. J. (2020). Host genotype and exercise exhibit species-level selection for members of the gut bacterial communities in the mouse digestive system. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65740-4>
- Drobná, E., Rauová, D., Májeková, H., Greif, G., & Mikuš, P. (2017). Antifungal activity and aflatoxin binding ability of *Lactobacillus* species isolated from lamb and goatling stomach mucus. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56(3), 255–264.
- Du, K., Wang, C., Liu, P., Li, Y., & Ma, X. (2017). Effects of Dietary Mycotoxins on Gut Microbiome. *Protein & Peptide Letters*, 24(5), 397–405. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170223095207>
- Duan, C. J., Baslé, A., Liberato, M. V., Gray, J., Nepogodiev, S. A., Field, R. A., Juge, N., & Ndeh, D. (2020). Ascertaining the biochemical function of an essential pectin methylesterase in the gut microbe bacteroides thetaiotaomicron. *Journal of Biological Chemistry*, 295(52), 18625–18637. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014974>
- Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5810–5817. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004>
- Duport, C., Jobin, M., & Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>
- Durant, L., Stentz, R., Noble, A., Brooks, J., Gicheva, N., Reddi, D., O'Connor, M. J., Hoyles, L., McCartney, A. L., Man, R., Pring, E. T., Dilke, S., Hendy, P., Segal, J. P., Lim, D. N. F., Misra, R., Hart, A. L., Arebi, N., Carding, S. R., & Knight, S. C. (2020). *Bacteroides thetaiotaomicron*-derived outer membrane vesicles promote regulatory dendritic cell responses in health but not in inflammatory bowel disease. *Microbiome*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00868-z>
- Dutta, D., & Lim, S. H. (2020). Bidirectional interaction between intestinal microbiome and

- cancer: Opportunities for therapeutic interventions. *Biomarker Research*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00211-6>
- Dworkin, M. (2006). *The Prokaryotes* (S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, & E. Stanckebrandt (eds.); Third). <http://link.springer.com/referencework/10.1007/0-387-30742-7/page/2>
- Dziarski, R., Park, S. Y., Kashyap, D. R., Dowd, S. E., & Gupta, D. (2016). Pglyrp-Regulated gut microflora prevotella falsenii, parabacteroides distasonis and bacteroides eggerthii enhance and alistipes finegoldii attenuates colitis in mice. *PLoS ONE*, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146162>
- Eberl, C., Ring, D., Münch, P. C., Beutler, M., Basic, M., Slack, E. C., Schwarzer, M., Srutkova, D., Lange, A., Frick, J. S., Bleich, A., & Stecher, B. (2020). Reproducible Colonization of Germ-Free Mice With the Oligo-Mouse-Microbiota in Different Animal Facilities. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02999>
- Egan, M., Dempsey, E., Ryan, C. A., Ross, R. P., & Stanton, C. (2021). The Sporobiota of the Human Gut. *Gut Microbes*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1863134>
- Elliott, I., Batty, E. M., Ming, D., Robinson, M. T., Nawtaisong, P., De Cesare, M., Newton, P. N., & Bowden, R. (2020). Oxford nanopore MinION sequencing enables rapid whole genome assembly of rickettsia typhi in a resource-limited setting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 408–414. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0383>
- Elshagabee, F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). Bacillus as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Eriguchi, Y., Nakamura, K., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Takahashi, S., Hashimoto, D., Teshima, T., Ayabe, T., Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (2018). Essential role of IFN- γ in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI Insight*, 3(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121886>
- Etzel, R. A. (2006). What the Primary Care Pediatrician Should Know about Syndromes Associated with Exposures to Mycotoxins. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 36(8), 282–305. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2006.05.003>
- Faas, M. M., Liu, Y., Borghuis, T., van Loo-Bouwman, C. A., Harmsen, H., & de Vos, P. (2020). Microbiota Induced Changes in the Immune Response in Pregnant Mice. *Frontiers in Immunology*, 10(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02976>
- Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>

- Feehley, T., Plunkett, C. H., Bao, R., Choi Hong, S. M., Culleen, E., Belda-Ferre, P., Campbell, E., Aitoro, R., Nocerino, R., Paparo, L., Andrade, J., Antonopoulos, D. A., Berni Canani, R., & Nagler, C. R. (2019). Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature Medicine*, 25(3), 448–453. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0324-z>
- Feng, K., Costa, J., & Edwards, J. S. (2018). Next-generation sequencing library construction on a surface. *BMC Genomics*, 19(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4797-4>
- Feng, Z., Long, W., Hao, B., Ding, D., Ma, X., Zhao, L., & Pang, X. (2017). A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0208-7>
- Fielding, R., Reeves, A., Jasuja, R., Liu, C., Barret, B., & Lustgarten, M. S. (2019). *Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults*. 617, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110722>.Muscle
- Finegold, S. M., Song, Y., Liu, C., Hecht, D. W., Summanen, P., Könönen, E., & Allen, S. D. (2005). Clostridium clostridioforme: A mixture of three clinically important species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(5), 319–324. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-1334-6>
- Finegold, Sydney M., Downes, J., & Summanen, P. H. (2012). Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*, 18(2), 260–262. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.018>
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2014). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 760(December 2013), 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Fricke, A. M., Podlesny, D., & Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of Advanced Research*, 19, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006>
- Galarza-Seeber, R., Latorre, J. D., Bielke, L. R., Kuttappan, V. A., Wolfenden, A. D., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Vicente, J. L., Donoghue, A., Cross, D., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2016). Leaky Gut and Mycotoxins: Aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(FEB). <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00010>
- Gao, Y., Meng, L., Liu, H., Wang, J., & Zheng, N. (2020). The compromised intestinal barrier induced by mycotoxins. *Toxins*, 12(10), 1–42. <https://doi.org/10.3390/toxins12100619>
- Garza, D. R., Taddese, R., Wirbel, J., Zeller, G., Boleij, A., Huynen, M. A., & Dutilh, B. E. (2020). Metabolic models predict bacterial passengers in colorectal cancer. *Cancer & Metabolism*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40170-020-0208-9>
- Geerlings, S., Kostopoulos, I., de Vos, W., & Belzer, C. (2018). Akkermansia muciniphila

in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? *Microorganisms*, 6(3), 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030075>

Genomics, M. (2021). *HighPrep PCR Protocol*. 1.10.

Gerardo, S. H., Garcia, M. M., Wexler, H. M., & Finegold, S. M. (1998). Adherence of *Bilophila wadsworthia* to cultured human embryonic intestinal cells. *Anaerobe*, 4(1), 19–27. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0134>

Gibiino, G., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Rizzatti, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2018). Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Digestive and Liver Disease*, 50(7), 635–639. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.016>

Gong, Y. Y., Watson, S., & Routledge, M. N. (2016). Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies. *Food Safety*, 4(1), 14–27. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2015026>

González Pereyra, M. L., Di Giacomo, A. L., Lara, A. L., Martínez, M. P., & Cavaglieri, L. (2020). Aflatoxin-degrading *Bacillus* sp. strains degrade zearalenone and produce proteases, amylases and cellulases of agro-industrial interest. *Toxicon*, 180(January), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.006>

González Pereyra, M. L., Martínez, M. P., & Cavaglieri, L. R. (2019). Presence of *aiiA* homologue genes encoding for N-Acyl homoserine lactone-degrading enzyme in aflatoxin B₁-decontaminating *Bacillus* strains with potential use as feed additives. *Food and Chemical Toxicology*, 124(March 2018), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.016>

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

Grenier, B., & Applegate, T. J. (2013). Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins*, 5(2), 396–430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>

Grondin, J. M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D. W., & Brumer, H. (2017). Polysaccharide utilization loci: Fueling microbial communities. *Journal of Bacteriology*, 199(15), 1–15. <https://doi.org/10.1128/JB.00860-16>

Groopman, J. D., Egner, P. A., Schulze, K. J., Wu, L. S. F., Merrill, R., Mehra, S., Shamim, A. A., Ali, H., Shaikh, S., Gernand, A., Khatry, S. K., LeClerq, S. C., West, K. P., & Christian, P. (2014). Aflatoxin exposure during the first 1000 days of life in rural South Asia assessed by aflatoxin B₁-lysine albumin biomarkers. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.09.016>

Groot, P., Nikolic, T., Pellegrini, S., Sordi, V., Imangaliyev, S., Rampanelli, E., Hanssen, N., Attaye, I., Bakker, G., Duinkerken, G., Joosten, A., Prodan, A., Levin, E., Levels, H.,

- Potter Van Loon, B., Van Bon, A., Brouwer, C., Van Dam, S., Simsek, S., ... Nieuwdorp, M. (2021). Faecal microbiota transplantation halts progression of human new-onset type 1 diabetes in a randomised controlled trial. *Gut*, *70*(1), 92–105. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322630>
- Grosu, I. A., Pistol, G. C., Taranu, I., & Marin, D. E. (2019). The impact of dietary grape seed meal on healthy and aflatoxin b1 afflicted microbiota of pigs after weaning. *Toxins*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins11010025>
- Gu, Y., Ding, Y., Ren, C., Sun, Z., Rodionov, D. A., Zhang, W., Yang, S., Yang, C., & Jiang, W. (2010). Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in Firmicutes. *BMC Genomics*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-255>
- Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., & Niu, T. (2008). Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*(8), 1489–1503. <https://doi.org/10.3390/ijms9081489>
- Guerre, P. (2020). Mycotoxin and Gut Microbiota Interactions. *Toxins*, *12*(12), 1–33. <https://doi.org/10.3390/toxins12120769>
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., & He, P. (2020). Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>
- Guo, Y., Wang, B., Wang, T., Gao, L., Yang, Z. J., Wang, F. F., Shang, H. W., Hua, R., & Xu, J. D. (2020). Biological characteristics of il-6 and related intestinal diseases. *International Journal of Biological Sciences*, *17*(1), 204–219. <https://doi.org/10.7150/ijbs.51362>
- Gurry, T. (2017). Synbiotic approaches to human health and well-being. *Microbial Biotechnology*, *10*(5), 1070–1073. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12789>
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, *51*, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>
- Haakensen, M., Dobson, C. M., Deneer, H., & Ziola, B. (2008). Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(3), 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.002>
- Haas, K. N., & Blanchard, J. L. (2017). *Kineothrix alysoides*, gen. Nov., sp. nov., a saccharolytic butyrate-producer within the family Lachnospiraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(2), 402–410. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001643>
- Han, W., Hong, X., Bencivenga-barry, N. A., Goodman, A. L., & Groisman, E. A. (2020). A Master Regulator of *Bacteroides thetaiotaomicron* Gut. *MBio*, *January*, 1–14.
- Harel, N., Meir, M., Gophna, U., & Stern, A. (2019). Direct sequencing of RNA with

- MinION Nanopore: Detecting mutations based on associations. *Nucleic Acids Research*, 47(22). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz907>
- Harmsen, H. J. M., & de Goffau, M. C. (2016). JRC F7 - Knowledge for Health and Consumer Safety, The Human Gut Microbiota: Overview and analysis of the current scientific knowledge and possible impact on healthcare and well-being. In *EUR 29240 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg* (Vol. 902). <https://doi.org/10.2760/17381>
- Hay, C. Y., & Sherris, D. A. (2020). Staphylococcus lentus Sinusitis: A New Sinonasal Pathogen. *Ear, Nose and Throat Journal*, 99(6), NP62–NP63. <https://doi.org/10.1177/0145561319848990>
- He, T., Zhu, Y. H., Yu, J., Xia, B., Liu, X., Yang, G. Y., Su, J. H., Guo, L., Wang, M. L., & Wang, J. F. (2019). Lactobacillus johnsonii L531 reduces pathogen load and helps maintain short-chain fatty acid levels in the intestines of pigs challenged with Salmonella enterica Infantis. *Veterinary Microbiology*, 230(2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.003>
- Heikema, A. P., Horst-Kreft, D., Boers, S. A., Jansen, R., Hiltemann, S. D., de Koning, W., Kraaij, R., de Ridder, M. A. J., van Houten, C. B., Bont, L. J., Stubbs, A. P., & Hays, J. P. (2020). Comparison of illumina versus nanopore 16s rRNA gene sequencing of the human nasal microbiota. *Genes*, 11(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes11091105>
- Hiippala, K. (2020). *EPITHELIAL INTERACTIONS OF GRAM-NEGATIVE COMMENSALS IN HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT Kaisa Hiippala*.
- Hsiao, A., Ahmed, A. M., Subramanian, S., Griffin, N., Drewry, L., Petri, W., Haque, R., Ahmed, T., & Gordon, J. (2014). Members of the human gut microbiota involved in recovery from Vibrio cholerae infection. *Nature*, 423–426. <https://doi.org/10.1126/science.1249098.Sleep>
- Huang, C. H., Shen, C. C., Liang, Y. C., & Jan, T. R. (2016). The probiotic activity of Lactobacillus murinus against food allergy. *Journal of Functional Foods*, 25(1), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.006>
- Huang, Y., Shi, X., Li, Z., Shen, Y., Shi, X., Wang, L., Li, G., Yuan, Y., Wang, J., Zhang, Y., Zhao, L., Zhang, M., Kang, Y., & Liang, Y. (2018). Possible association of firmicutes in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 3329–3337. <https://doi.org/10.2147/NDT.S188340>
- Ifo, S. A., Moutsambote, J. M., Koubouana, F., Yoka, J., Ndzai, S. F., Bouetou-Kadilamio, L. N. O., Mampouya, H., Jourdain, C., Bocko, Y., Mantota, A. B., Mbemba, M., Mouanga-Sokath, D., Odende, R., Mondzali, L. R., Wenina, Y. E. M., Ouissika, B. C., & Joel, L. J. (2016). Tree Species Diversity, Richness, and Similarity in Intact and Degraded Forest in the Tropical Rainforest of the Congo Basin: Case of the Forest of Likouala in the Republic of Congo. *International Journal of Forestry Research*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/7593681>

- Illumina Inc. (2017). Illumina sequencing introduction. *Illumina Sequencing Introduction, October*, 1–8. https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Illumina Inc. (2021). *A beginner's guide to NGS*. <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html>
- Isani, M., Bell, B. A., Delaplain, P. T., Bowling, J. D., Golden, J. M., Elizee, M., Illingworth, L., Wang, J., Gayer, C. P., Grishin, A. V., & Ford, H. R. (2018). *Lactobacillus murinus* HF12 colonizes neonatal gut and protects rats from necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196710>
- Jašarević, E., Howard, C. D., Morrison, K., Misić, A., Weinkopff, T., Scott, P., Hunter, C., Beiting, D., & Bale, T. L. (2018). The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus. *Nature Neuroscience*, *21*(8), 1061–1071. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0182-5>
- Jebali, R., Ben Salah-Abbès, J., Abbès, S., Hassan, A. M., Abdel-Aziem, S. H., El-Nekeety, A. A., Oueslati, R., & Abdel-Wahhab, M. A. (2018). *Lactobacillus plantarum* alleviate aflatoxins (B1 and M1) induced disturbances in the intestinal genes expression and DNA fragmentation in mice. *Toxicon*, *146*, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.008>
- Jeffery, I. B., Das, A., O’Herlihy, E., Coughlan, S., Cisek, K., Moore, M., Bradley, F., Carty, T., Pradhan, M., Dwibedi, C., Shanahan, F., & O’Toole, P. W. (2020). Differences in Fecal Microbiomes and Metabolomes of People With vs Without Irritable Bowel Syndrome and Bile Acid Malabsorption. *Gastroenterology*, *158*(4), 1016-1028.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.301>
- Jeßberger, N., Dietrich, R., Bock, S., Didier, A., & Märtlbauer, E. (2014). *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*, *77*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.028>
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märtlbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* Food Infection as Multifactorial Process. *Toxins*, *12*(11), 1–37. <https://doi.org/10.3390/toxins12110701>
- Jia, W., Rajani, C., Xu, H., & Zheng, X. (2020). Gut microbiota alterations are distinct for primary colorectal cancer and hepatocellular carcinoma. *Protein and Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00748-0>
- Jiang, M., Peng, X., Fang, J., Cui, H., Yu, Z., & Chen, Z. (2015). Effects of aflatoxin B1 on t-cell subsets and mRNA expression of cytokines in the intestine of broilers. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4), 6945–6959. <https://doi.org/10.3390/ijms16046945>

- Jin, J., Beekmann, K., Ringø, E., Rietjens, I. M. C. M., & Xing, F. (2021). Interaction between food-borne mycotoxins and gut microbiota: A review. *Food Control*, 126(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107998>
- Jolly, P. E., Jiang, Y., Ellis, W. O., Sheng-Wang, J., Afriyie-Gyawu, E., Phillips, T. D., & Williams, J. H. (2008). Modulation of the human immune system by aflatoxin. *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, December 2015, 41–52. <https://doi.org/10.1079/9781845930820.0041>
- Kai, S., Matsuo, Y., Nakagawa, S., Kryukov, K., Matsukawa, S., Tanaka, H., Iwai, T., Imanishi, T., & Hirota, K. (2019). Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*, 9(3), 548–557. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12590>
- Kamo, T., Akazawa, H., Suda, W., Saga-Kamo, A., Shimizu, Y., Yagi, H., Liu, Q., Nomura, S., Naito, A. T., Takeda, N., Harada, M., Toko, H., Kumagai, H., Ikeda, Y., Takimoto, E., Suzuki, J. I., Honda, K., Morita, H., Hattori, M., & Komuro, I. (2017). Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS ONE*, 12(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174099>
- Kasmani, F., Karimi Torshizi, M. A., Allameh, A., & Shariatmadari, F. (2012). A novel aflatoxin-binding Bacillus probiotic: Performance, serum biochemistry, and immunological parameters in Japanese quail. *Poultry Science*, 91(8), 1846–1853. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01830>
- Kasten, M. J., Rosenblatt, J. E., & Gustafson, D. R. (1992). Bilophila wadsworthia bacteremia in two patients with hepatic abscesses. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2502–2503. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2502-2503.1992>
- Kchouk, M., Gibrat, J. F., & Elloumi, M. (2017). Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 09(03). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>
- Ke, X., Walker, A., Haange, S. B., Lagkouvardos, I., Liu, Y., Schmitt-Kopplin, P., von Bergen, M., Jehmlich, N., He, X., Clavel, T., & Cheung, P. C. K. (2019). Synbiotic-driven improvement of metabolic disturbances is associated with changes in the gut microbiome in diet-induced obese mice. *Molecular Metabolism*, 22(February), 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.012>
- Kim, E. J., Kim, Y. C., Ahn, J. Y., Jeong, S. J., Ku, N. S., Choi, J. Y., Yeom, J. S., & Song, Y. G. (2019). Risk factors for mortality in patients with Stenotrophomonas maltophilia bacteremia and clinical impact of quinolone-resistant strains. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4394-4>
- Kim, H., Kim, T., Kang, J., Kim, Y., & Kim, H. (2020). Is lactobacillus gram-positive? A case study of lactobacillus iners. *Microorganisms*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070969>
- Klimkaitė, L., Armalytė, J., Skerniškytė, J., & Sužiedėlienė, E. (2020). *The Toxin-Antitoxin*

Systems of the Opportunistic Pathogen Stenotrophomonas maltophilia of Environmental and Clinical Origin. 1–18.

- Koh, Y., Kane, A., Lee, K., Xu, Q., Wu, X., Roper, J., Mason, J. B., & Crott, J. W. (2018). Parabacteroides distasonis attenuates toll-like receptor 4 signaling and Akt activation and blocks colon tumor formation in high-fat diet-fed azoxymethane-treated mice. *International Journal of Cancer*, *143*(7), 1797–1805. <https://doi.org/10.1002/ijc.31559>
- Koh, Y., Kane, A. V., Wu, X., & Crott, J. W. (2020). Parabacteroides distasonis attenuates tumorigenesis, modulates inflammatory markers and promotes intestinal barrier integrity in azoxymethane-treated A/J mice. *Carcinogenesis*, *41*(7), 909–917. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa018>
- Kostopoulos, I., Elzinga, J., Ottman, N., Klievink, J. T., Blijenberg, B., Aalvink, S., Boeren, S., Mank, M., Knol, J., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2020). Akkermansia muciniphila uses human milk oligosaccharides to thrive in the early life conditions in vitro. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71113-8>
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. *Microbes and Infection*, *2*(2), 189–198. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00269-0)
- Kraieski, A. L., Hayashi, R. M., Sanches, A., Almeida, G. C., & Santin, E. (2017). Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeira vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: Applying an Intestinal Health Index. *Poultry Science*, *96*(5), 1078–1087. <https://doi.org/10.3382/ps/pew397>
- Kumbhare, S. V., Patangia, D. V., Patil, R. H., Shouche, Y. S., & Patil, N. P. (2019). Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. *Journal of Biosciences*, *44*(2). <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9860-z>
- Kushkevych, I. (2014). Dose-dependent effect of electron acceptor and donor on dissimilatory sulfate reduction by bacteria Desulfovibrio Piger Vib-7 of human intestine. *Studia Biologica*, *8*(1), 103–116. <https://doi.org/10.30970/sbi.0801.313>
- Kushkevych, I., Bolis, M., & Bartos, M. (2019). Model-based Characterization of the Parameters of Dissimilatory Sulfate Reduction Under the Effect of Different Initial Density of Desulfovibrio piger Vib-7 Bacterial Cells. *The Open Microbiology Journal*, *9*(1), 55–69. <https://doi.org/10.2174/1874285801509010055>
- Kushkevych, I., Dordević, D., Kollar, P., Vítězová, M., & Drago, L. (2019). Hydrogen Sulfide as a Toxic Product in the Small–Large Intestine Axis and its Role in IBD Development. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(7), 1054. <https://doi.org/10.3390/jcm8071054>
- Kushkevych, I., Kos, J., Kollar, P., Kralova, K., & Jampilek, J. (2018). Activity of ring-substituted 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides against intestinal sulfate-reducing bacteria Desulfovibrio piger. *Medicinal Chemistry Research*, *27*(1), 278–284. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2067-7>

- Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Sokol, D., Hudcovic, T., Hrcir, T., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopecny, J., Verdu, E. F., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2011). Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(2), 250–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x>
- Laurain, B. Y. J., Feed, F. O. R., Product, F., & Laurain, J. (2018). Mycotoxin detoxification strategies , a review. *All About Feed*, 26(4), 13–14.
- Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P. A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., & Studholme, D. J. (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3(March), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.02.001>
- Lebovitz, Y., & Theus, M. H. (2019). Molecular phenotyping and genomic characterization of a novel neuroactive bacterium strain, Lactobacillus murinus HU-1. *Frontiers in Pharmacology*, 10(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01162>
- Lee, K. H., Song, Y., Wu, W., Yu, K., & Zhang, G. (2020). The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy. *Clinical and Molecular Allergy*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12948-020-00120-x>
- Lee, K., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2019). Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297–1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
- Lee, S. M., Donaldson, G. P., Mikulski, Z., Boyajian, S., Ley, K., Mazmanian, S. K., Engineering, B., & Jolla, L. (2014). Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. 501(7467), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature12447>. Bacterial
- Li, D., Lin, R., Xu, Y., Chen, Q., Deng, F., Deng, Y., & Wen, J. (2021). Cereulide Exposure Caused Cytopathogenic Damages of Liver and Kidney in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Li, W., Deng, Y., Chu, Q., & Zhang, P. (2019). Gut microbiome and cancer immunotherapy. *Cancer Letters*, 447(December 2018), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.015>
- Li, Z., Hu, G., Zhu, L., Sun, Z., Gao, M., & Zhan, X. (2020). Study of growth, metabolism, and morphology of Akkermansia muciniphila with an in vitro advanced bionic intestinal reactor. 1–12. <https://doi.org/10.1101/2020.07.06.190843>
- Liddicoat, C., Sydnor, H., Cando-Dumancela, C., Dresken, R., Liu, J., Gellie, N. J. C., Mills, J. G., Young, J. M., Weyrich, L. S., Hutchinson, M. R., Weinstein, P., & Breed, M. F. (2020). Naturally-diverse airborne environmental microbial exposures modulate the gut microbiome and may provide anxiolytic benefits in mice. *Science of the Total Environment*, 701, 134684. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134684>

- Lienhard, A., & Schäffer, S. (2019). Extracting the invisible: Obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *PeerJ*, 2019(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.6753>
- Liew, W. P. P., & Mohd-Redzwan, S. (2018). Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00060>
- Liew, W. P. P., Mohd-Redzwan, S., & Than, L. T. L. (2019). Gut microbiota profiling of aflatoxin b1-induced rats treated with *Lactobacillus casei shirota*. *Toxins*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins11010049>
- Lim, S., Chang, D. H., Ahn, S., & Kim, B. C. (2016). Whole genome sequencing of “*Faecalibaculum rodentium*” ALO17, isolated from C57BL/6J laboratory mouse feces. *Gut Pathogens*, 8(1), 3–9. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0087-3>
- Lim, S. M., Jang, H. M., Jeong, J. J., Han, M. J., & Kim, D. H. (2017). *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 attenuates colitis and memory impairment in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and NF- κ B activation. *Journal of Functional Foods*, 34, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.016>
- Limeta, A., Ji, B., Levin, M., Gatto, F., & Nielsen, J. (2020). Meta-analysis of the gut microbiota in predicting response to cancer immunotherapy in metastatic melanoma. *JCI Insight*, 5(23), 1–12. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140940>
- Lindberg, M. R., Schmedes, S. E., Hewitt, F. C., Haas, J. L., Ternus, K. L., Kadavy, D. R., & Budowle, B. (2016). A comparison and integration of MiSeq and MinION platforms for sequencing single source and mixed mitochondrial genomes. *PLoS ONE*, 11(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167600>
- Liu, H. Y., Roos, S., Jonsson, H., Ahl, D., Dicksved, J., Lindberg, J. E., & Lundh, T. (2015). Effects of *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus reuteri* on gut barrier function and heat shock proteins in intestinal porcine epithelial cells. *Physiological Reports*, 3(4), 1–13. <https://doi.org/10.14814/phy2.12355>
- Liu, N., Wang, J. Q., Jia, S. C., Chen, Y. K., & Wang, J. P. (2018). Effect of yeast cell wall on the growth performance and gut health of broilers challenged with aflatoxin B 1 and necrotic enteritis. *Poultry Science*, 97(2), 477–484. <https://doi.org/10.3382/ps/pex342>
- Liu, R., Hong, J., Xu, X., Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., Shi, J., Zhao, S., Liu, W., Wang, X., Xia, H., Liu, Z., Cui, B., Liang, P., Xi, L., Jin, J., Ying, X., Wang, X., Zhao, X., ... Wang, W. (2017). Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, 23(7), 859–868. <https://doi.org/10.1038/nm.4358>
- Losada, P. P., Caro, C. V., & Marteache, A. H. (2011). *Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the effect on the Spa - nish population of the derogation of national regulation on maximum allowed limits for aflatoxins B1, B2, G1 and G2*. 27–42.

- Loubinoux, Julie, Bronowicki, J. P., Pereira, I. A. C., Mougénel, J. L., & Le Faou, A. E. (2002). Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiology Ecology*, *40*(2), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00201-5)
- Loubinoux, Julien, Valente, F. M. A., Pereira, I. A. C., Costa, A., Grimont, P. A. D., & Le Faou, A. E. (2002). Reclassification of the only species of the genus *Desulfomonas*, *Desulfomonas pigra*, as *Desulfovibrio piger* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *52*(4), 1305–1308. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02175-0>
- Loureiro, L., & Gameiro, M. (2011). Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística. *Revista de Enfermagem Referência, III Série*(nº 3), 151–162. <https://doi.org/10.12707/riii1009>
- Lu, D., Huang, Y., Kong, Y., Tao, T., & Zhu, X. (2020). Gut microecology: Why our microbes could be key to our health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *131*(September), 110784. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110784>
- Luqman, A., Nega, M., Nguyen, M. T., Ebner, P., & Götz, F. (2018). SadA-Expressing Staphylococci in the Human Gut Show Increased Cell Adherence and Internalization. *Cell Reports*, *22*(2), 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.058>
- Ma, L., Deitch, E., Specian, R., Steffen, E., & Berg, R. (1990). Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, *20*(3), 177–184. <https://doi.org/10.1007/BF02091994>
- Magi, A., Semeraro, R., Mingrino, A., Giusti, B., & D'Aurizio, R. (2017). Nanopore sequencing data analysis: State of the art, applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx062>
- Mamic, P., Chaikijurajai, T., & Tang, W. H. W. (2021). Gut microbiome - A potential mediator of pathogenesis in heart failure and its comorbidities: State-of-the-art review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *152*(December 2020), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.12.001>
- Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G. A., Turrone, F., Cocconi, D., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix153>
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., & Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, *10*(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
- Marquet, P., Duncan, S. H., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., & Flint, H. J. (2009). Lactate has the potential to promote hydrogen sulphide formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, *299*(2), 128–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01750.x>

- Megrian, D., Taib, N., Witwinowski, J., Beloin, C., & Gribaldo, S. (2020). One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. *Molecular Microbiology*, *113*(3), 659–671. <https://doi.org/10.1111/mmi.14469>
- Meyer, K., Mohammad, M., Bode, L., Ma, J., Haymond, M., Aagaard, K., & Chu, D. (2017). Maternal diet structures the breast milk microbiome in association with human milk oligosaccharides and gut-associated bacteria. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *216*(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.11.911>
- Michalik, M., Samet, A., Podbielska-Kubera, A., Savini, V., Międzobrodzki, J., & Kosecka-Strojek, M. (2020). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: A review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00367-x>
- Modasia, A., Parker, A., Jones, E., Stentz, R., Brion, A., Goldson, A., Defernez, M., Wileman, T., Ashley Blackshaw, L., & Carding, S. R. (2020). Regulation of Enteroendocrine Cell Networks by the Major Human Gut Symbiont Bacteroides thetaiotaomicron. *Frontiers in Microbiology*, *11*(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575595>
- Momose, Y., Park, S. H., Miyamoto, Y., & Itoh, K. (2011). Design of species-specific oligonucleotide probes for the detection of Bacteroides and Parabacteroides by fluorescence in situ hybridization and their application to the analysis of mouse caecal Bacteroides-Parabacteroides microbiota. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(1), 176–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05039.x>
- Mondot, S., Lepage, P., Seksik, P., Allez, M., Tréton, X., Bouhnik, Y., Colombel, J. F., Leclerc, M., Pochart, P., Doré, J., & Marteau, P. (2016). Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn’s disease remission after surgery. *Gut*, *65*(6), 954–962. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309184>
- Mortaş, H., Bilici, S., & Karakan, T. (2020). The circadian disruption of night work alters gut microbiota consistent with elevated risk for future metabolic and gastrointestinal pathology. *Chronobiology International*, *37*(7), 1067–1081. <https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1778717>
- Mosca, A., Leclerc, M., & Hugot, J. P. (2016). Gut microbiota diversity and human diseases: Should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>
- Mudter, J., & Neurath, M. (2007). Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory Bowel Diseases*. <https://doi.org/10.1002/ibd.20148>
- Nakajima, A., Sasaki, T., Itoh, K., Kitahara, T., Takema, Y., Hiramatsu, K., Ishikawa, D., Shibuya, T., Kobayashi, O., Osada, T., Watanabe, S., & Nagahara, A. (2020). A soluble fiber diet increases Bacteroides fragilis group abundance and immunoglobulin a

- production in the gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00405-20>
- Natividad, J. M., Lamas, B., Pham, H. P., Michel, M. L., Rainteau, D., Bridonneau, C., Da Costa, G., Van Hylckama Vlieg, J., Sovran, B., Chamignon, C., Planchais, J., Richard, M. L., Langella, P., Veiga, P., & Sokol, H. (2018). *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nature Communications*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05249-7>
- Negash, D. (2018). A review of aflatoxin: occurrence, prevention, and gaps in both food and feed safety. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 8(2), 190–197. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2018.08.00268>
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Nones, J., Solhaug, A., Eriksen, G. S., Macuvele, D. L. P., Poli, A., Soares, C., Trentin, A. G., Riella, H. G., & Nones, J. (2017). Bentonite modified with zinc enhances aflatoxin B1 adsorption and increase survival of fibroblasts (3T3) and epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2). *Journal of Hazardous Materials*, 337, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.068>
- Nyangahu, D. D., Lennard, K. S., Brown, B. P., Darby, M. G., Wendoh, J. M., Havyarimana, E., Smith, P., Butcher, J., Stintzi, A., Mulder, N., Horsnell, W., & Jaspán, H. B. (2018). Disruption of maternal gut microbiota during gestation alters offspring microbiota and immunity. *Microbiome*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0511-7>
- Ogunade, I. M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034–4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>
- Ose, R., Hirano, K., Maeno, S., Nakagawa, J., Salminen, S., Tochio, T., & Endo, A. (2018). The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: Novel means for microbiota modulation? *Anaerobe*, 51, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.018>
- Ouyang, J., Lin, J., Isnard, S., Fombuena, B., Peng, X., Murette, A., Routy, B., Messaoudene, M., Chen, Y., & Routy, J. P. (2020). The Bacterium *Akkermansia muciniphila*: A Sentinel for Gut Permeability and Its Relevance to HIV-Related Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00645>
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M. S., & Timonen, T. (2002). Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 129(3), 420–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01898.x>

- Palmisano, S., Campisciano, G., Iacuzzo, C., Bonadio, L., Zucca, A., Cosola, D., Comar, M., & de Manzini, N. (2020). Role of preoperative gut microbiota on colorectal anastomotic leakage: preliminary results. *Updates in Surgery*, 72(4), 1013–1022. <https://doi.org/10.1007/s13304-020-00720-x>
- Pan, F., Zhang, L., Li, M., Hu, Y., Zeng, B., Yuan, H., Zhao, L., & Zhang, C. (2018). Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice. *Microbiome*, 6(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0440-5>
- Parker, A., Fonseca, S., & Carding, S. R. (2020). Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes*, 11(2), 135–157. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1638722>
- Patrick, S. (2014). *Molecular Medical Microbiology* (Academic Press (ed.); 2nd ed.).
- Peck, S. C., Denger, K., Burrichter, A., Irwin, S. M., Balskus, E. P., & Schleheck, D. (2019). A glycyl radical enzyme enables hydrogen sulfide production by the human intestinal bacterium *Bifidobacterium wadsworthia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 3171–3176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815661116>
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., & Salminen, S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2152–2156. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74660-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74660-7)
- Pequegnat, B., & Monteiro, M. A. (2019). Carbohydrate Scaffolds for the Study of the Autism-associated Bacterium, *Clostridium bolteae*. *Current Medicinal Chemistry*, 26(35), 6341–6348. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190225164527>
- Pequegnat, B., Sagermann, M., Valliani, M., Toh, M., Chow, H., Allen-Vercoe, E., & Monteiro, M. A. (2013). A vaccine and diagnostic target for *Clostridium bolteae*, an autism-associated bacterium. *Vaccine*, 31(26), 2787–2790. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.018>
- Perillo, F., Amoroso, C., Strati, F., Giuffrè, M. R., Díaz-Basabe, A., Lattanzi, G., & Facciotti, F. (2020). Gut microbiota manipulation as a tool for colorectal cancer management: Recent advances in its use for therapeutic purposes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21155389>
- Pham, T. A. N., & Lawley, T. D. (2014). Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections. *Current Opinion in Microbiology*, 17(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.12.002>
- Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystron, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005>
- Rachid, R., Stephen-Victor, E., & Chatila, T. A. (2021). The microbial origins of food

- allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.12.624>
- Ran, S., Mu, C., & Zhu, W. (2019). Diversity and community pattern of sulfate-reducing bacteria in piglet gut. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0346-5>
- Reese, A. & D. R. (2018, July 31). *Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance*. 1–14.
- Ren, Z., Guo, C., Yu, S., Zhu, L., Wang, Y., Hu, H., & Deng, J. (2019). Progress in mycotoxins affecting intestinal mucosal barrier function. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112777>
- Rey, F. E., Gonzalez, M. D., Cheng, J., Wu, M., Ahern, P. P., & Gordon, J. I. (2013). Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13582–13587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312524110>
- Ricotta, C., & Szeidl, L. (2006). Towards a unifying approach to diversity measures: Bridging the gap between the Shannon entropy and Rao's quadratic index. *Theoretical Population Biology*, 70(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2006.06.003>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Risely, A. (2020). Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *Journal of Animal Ecology*, 89(7), 1549–1558. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>
- Rodriguez-Díaz, J., & Monedero, V. (2013). Probiotics against Digestive Tract Viral Infections. In R. Watson & V. Preedy (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease* (pp. 271–284). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2011-0-07464-1>
- Rosado, T., Dias, L., Lança, M., Nogueira, C., Santos, R., Martins, M. R., Candeias, A., Mirão, J., & Caldeira, A. T. (2020). Assessment of microbiota present on a Portuguese historical stone convent using high-throughput sequencing approaches. *MicrobiologyOpen*, 9(6), 1067–1084. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1030>
- Ruder, B., Atreya, R., & Becker, C. (2019). Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081887>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124(January), 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>

- Saarela, M. H. (2019). Safety aspects of next generation probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 30, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.001>
- Sadowsky, M. J., Staley, C., Heiner, C., Hall, R., Kelly, C. R., Brandt, L., & Khoruts, A. (2017). Analysis of gut microbiota—An ever changing landscape. *Gut Microbes*, 8(3), 268–275. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1277313>
- Sanidad, K. Z., & Zeng, M. Y. (2020). Neonatal gut microbiome and immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.011>
- Sanna, S., Zuydam, N. R. Van, Mahajan, A., Kurilshikov, A., Vila, A. V., Mujagic, Z., Masclee, A. A. M., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., Franke, L., Fu, J., Wijmenga, C., Mccarthy, M. I., Hospital, C., Gastroenterology-hepatology, D., Coeliac, K. G. J., & Hospital, J. R. (2019, October 1). *Causal relationships between gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases*. 51(4), 600–605. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0350-x.Causal>
- Santos, A., van Aerle, R., Barrientos, L., & Martinez-Urtaza, J. (2020). Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.01.005>
- Sarron, E., Pérot, M., Barbezier, N., Delayre-Orthez, C., Gay-Quéheillard, J., & Anton, P. M. (2020). Early exposure to food contaminants reshapes maturation of the human brain-gut-microbiota axis. *World Journal of Gastroenterology*, 26(23), 3145–3169. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i23.3145>
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., & Quince, C. (2015). Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, 43(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gku1341>
- Schirmer, M., Smeekens, S. P., Vlamakis, H., Jaeger, M., Oosting, M., Franzosa, E. A., Jansen, T., Jacobs, L., Bonder, M. J., Kurilshikov, A., Fu, J., Joosten, L. A. B., Zhernakova, A., Huttenhower, C., Wijmenga, C., Netea, M. G., & Xavier, R. J. (2016). Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell*, 167(4), 1125–1136.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.020>
- Schumacher, U. K., Eiring, P., & Hacker, F. M. (1997). Incidence of *Bilophila wadsworthia* in appendiceal, peritoneal and fecal samples from children. *Clinical Microbiology and Infection*, 3(1), 134–136. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00264.x>
- Schwartz, A., Hold, G. L., Duncan, S. H., Gruhl, B., Collins, M. D., Lawson, P. A., Flint, H. J., & Blaut, M. (2002). *Anaerostipes caccae* gen. nov., sp. nov., a new saccharolytic, acetate-utilising, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), 46–51. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00096>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>

- Shaker, M. N., Hmdan, T. A., & Issa, A. H. (2018). Isolation and Diagnosis of Staphylococcus lentus from Different Operation Theater Hospitals. *Scientific Journal of Medical Research*, 02(08), 177–181. <https://doi.org/10.37623/sjmr.2018.2804>
- Shan, Y. (2019). The Toxic Effects of Aflatoxin B1: An Update. In X.-D. Long (Ed.), *Aflatoxin B1 Occurrence, Detection and Toxicological Effects*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88775>
- Shin, J., Lee, S., Go, M. J., Lee, S. Y., Kim, S. C., Lee, C. H., & Cho, B. K. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Scientific Reports*, 6(July), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep29681>
- Silva, S., Venceslau, S. S., Fernandes, C. L. V., Valente, F. M. A., & Pereira, I. A. C. (2008). Hydrogen as an energy source for the human pathogen *Bilophila wadsworthia*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93(4), 381–390. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9215-x>
- Silva, Y., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Singh, A. K., Hertzberger, R. Y., & Knaus, U. G. (2018). Hydrogen peroxide production by lactobacilli promotes epithelial restitution during colitis. *Redox Biology*, 16(December 2017), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.02.003>
- Sitkin, S., & Pokrotnieks, J. (2019). Gut Microbiota as a Host Defender and a Foe: The 2 Faces of Commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 25(6), E71. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy377>
- Smith, L. E., Prendergast, A. J., Turner, P. C., Humphrey, J. H., & Stoltzfus, R. J. (2017). Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(4), 770–776. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0730>
- Smyth, D., Phan, V., Wang, A., & McKay, D. M. (2011). Interferon- γ -induced increases in intestinal epithelial macromolecular permeability requires the Src kinase Fyn. *Laboratory Investigation*, 91(5), 764–777. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.208>
- Soeorg, H., Metsvaht, T., Eelmäe, I., Merila, M., Treumuth, S., Huik, K., Jürna-Ellam, M., Ilmoja, M. L., & Lutsar, I. (2017). The role of breast milk in the colonization of neonatal gut and skin with coagulase-negative staphylococci. *Pediatric Research*, 82(5), 759–767. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.150>
- Song, Y., Liu, C., Molitoris, D. R., Tomzynski, T. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., & Finegold, S. M. (2003). *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 84–89. <https://doi.org/10.1078/072320203322337353>
- Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of

- human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- Spehlmann, M. E., & Eckmann, L. (2009). Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(2), 92–99. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328324f857>
- Steinway, S. N., Biggs, M. B., Loughran, T. P., Papin, J. A., & Albert, R. (2015). Inference of Network Dynamics and Metabolic Interactions in the Gut Microbiome. *PLoS Computational Biology*, 11(6), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004338>
- Summanen, P. H., Simies-Somer, H., Manley, S., Bruckner, D., Marina, M., Goldstein, E. J. C., & Finegold, S. M. (1995). *Bilophila wadsworthia* Isolates from clinical specimens. *Clinical Infectious Diseases*, 20(7), S210–S211. https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement_2.S210
- Sun, T., Liu, S., Zhou, Y., Yao, Z., Zhang, D., Cao, S., Wei, Z., Tan, B., Li, Y., Lian, Z., & Wang, S. (2017). Evolutionary biologic changes of gut microbiota in an “adenoma-carcinoma sequence” mouse colorectal cancer model induced by 1, 2-dimethylhydrazine. *Oncotarget*, 8(1), 444–457. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13443>
- Sylvia, K. E., & Demas, G. E. (2018). A gut feeling: Microbiome-brain-immune interactions modulate social and affective behaviors. *Hormones and Behavior*, 99(September 2017), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.02.001>
- Taheur, F. Ben, Fedhila, K., Chaieb, K., Kouidhi, B., Bakhrouf, A., & Abrunhosa, L. (2017). Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021>
- Tan, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Research International*, 116(1800), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.088>
- Tanaka, M., & Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergology International*, 66(4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>
- Tao, Y. N., Tong, X. K., Qian, C., Wan, H., & Zuo, J. P. (2020). Microbial quantitation of colostrum from healthy breastfeeding women and milk from mastitis patients. *Annals of Palliative Medicine*, 9(4), 1666–1680. <https://doi.org/10.21037/apm-20-56>
- Taras, D., Simmering, R., Collins, M. D., Lawson, P. A., & Blaut, M. (2002). Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 423–428. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-423>
- Technologies, O. N. (2021). *Analysis solutions for nanopore sequencing data*.

<https://nanoporetech.com/nanopore-sequencing-data-analysis#tabs-0=epi2me>

- Telle-Hansen, V. H., Holven, K. B., & Ulven, S. M. (2018). Impact of a healthy dietary pattern on gut microbiota and systemic inflammation in humans. *Nutrients*, *10*(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu10111783>
- Then, C. K., Paillas, S., Wang, X., Hampson, A., & Kiltie, A. E. (2020). Association of *Bacteroides acidifaciens* relative abundance with high-fibre diet-associated radiosensitisation. *BMC Biology*, *18*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00836-x>
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology*, *2*(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, *474*(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tierney, B. T., He, Y., Church, G. M., Segal, E., Kostic, A. D., Patel, C. J., Biology, R., & Mathematics, A. (2020). *The predictive power of the microbiome exceeds that of genome-wide association studies in the discrimination of complex human disease.*
- Tomková, I., Ševčíková, Z., Levkut, M., Revajová, V., Čonková, E., Laciaková, A., & Lenhardt, L. (2002). Effect of aflatoxin B1 on CD3 T cells and alkaline phosphatase in the intestine of mice. *Mycopathologia*, *154*(1), 15–19. <https://doi.org/10.1023/A:1015296523901>
- Trastoy, B., Naegeli, A., Anso, I., Sjögren, J., & Guerin, M. E. (2020). Structural basis of mammalian mucin processing by the human gut O-glycopeptidase OgpA from *Akkermansia muciniphila*. *Nature Communications*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18696-y>
- Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2020). *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology*, *xx*(xx), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>
- Turrone, F., Milani, C., Duranti, S., Lugli, G. A., Bernasconi, S., Margolles, A., Di Pierro, F., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2020). The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. *Italian Journal of Pediatrics*, *46*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13052-020-0781-0>
- Ubeda, C., Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N. C., Equinda, M., Lipuma, L., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Taur, Y., Jenq, R. R., van den Brink, M. R. M., Xavier, J. B., & Pamer, E. G. (2013). Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infection and Immunity*, *81*(3), 965–973. <https://doi.org/10.1128/IAI.01197-12>
- Ulsemer, P., Toutounian, K., Kressel, G., Goletz, C., Schmidt, J., Karsten, U., Hahn, A., & Goletz, S. (2016). Impact of oral consumption of heat-treated *Bacteroides xylanisolvens*

- DSM 23964 on the level of natural TFA-specific antibodies in human adults. *Beneficial Microbes*, 7(4), 485–500. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0143>
- Ulsemer, Philippe. (2012). Safety assessment of the commensal strain *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62(2), 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.10.014>
- Ulsemer, Philippe, Toutounian, K., Schmidt, J., Karsten, U., & Goletz, S. (2012). Preliminary safety evaluation of a new *Bacteroides xylanisolvens* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 528–535. <https://doi.org/10.1128/AEM.06641-11>
- Vaga, S., Lee, S., Ji, B., Andreasson, A., Talley, N. J., Agréus, L., Bidkhorji, G., Kovatcheva-Datchary, P., Park, J., Lee, D., Proctor, G., Ehrlich, S. D., Nielsen, J., Engstrand, L., & Shoaie, S. (2020). Compositional and functional differences of the mucosal microbiota along the intestine of healthy individuals. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71939-2>
- Van Eldere, J., De Pauw, G., & Eyssen, H. J. (1987). Steroid sulfatase activity in a *Peptococcus niger* strain from the human intestinal microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1655–1660. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1655-1660.1987>
- Van Eldere, J., Parmentier, G., Asselberghs, S., & Eyssen, H. (1991). Partial characterization of the steroidal sulfatases in *Peptococcus niger* H4. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), 69–76. <https://doi.org/10.1128/aem.57.1.69-76.1991>
- Van Eldere, J., Robben, J., De Pauw, G., Merckx, R., & Eyssen, H. (1988). Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 2112–2117. <https://doi.org/10.1128/aem.54.8.2112-2117.1988>
- Veiga, P., Pons, N., Agrawal, A., Oozer, R., Guyonnet, D., Brazeilles, R., Faurie, J. M., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Houghton, L. A., Whorwell, P. J., Ehrlich, S. D., & Kennedy, S. P. (2014). Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Scientific Reports*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep06328>
- Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., & Charette, S. J. (2017). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.016>
- Voth-Gaeddert, L. E., Torres, O., Maldonado, J., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B. E., & Oerther, D. B. (2019). Aflatoxin Exposure, Child Stunting, and Dysbiosis in the Intestinal Microbiome among Children in Guatemala. *Environmental Engineering Science*, 36(8), 958–968. <https://doi.org/10.1089/ees.2019.0104>
- Waldner, M. J., & Neurath, M. F. (2014). Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Seminars in Immunology*, 26(1), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.12.003>

- Wang, J. (2017). *TOXIC AND HEALTH IMPACTS OF AFLATOXIN B1 AND GREEN TEA POLYPHENOLS ON THE GUT MICROBIOME IN RATS*.
- Wang, J., Tang, L., Glenn, T. C., & Wang, J. S. (2016). Aflatoxin B1 induced compositional changes in gut microbial communities of male F344 rats. *Toxicological Sciences*, *150*(1), 54–63. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv259>
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S. J., & Liu, H. (2019). Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Reports*, *26*(1), 222–235.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028>
- Wang, M., Yin, S., Qin, Q., Peng, Y., Hu, Z., Zhu, X., Liu, L., & Li, X. (2021). Stenotrophomonas-maltophilia inhibits host cellular immunity by activating PD-1/PD-L1 signaling pathway to induce T-cell exhaustion. *Molecular Immunology*, *130*(December 2020), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.12.019>
- Wang, S., Xiao, Y., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. *Journal of Functional Foods*, *66*(January). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103838>
- Wang, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., Wang, M., & Wang, L. (2018). Aflatoxin B1 (AFB1) induced dysregulation of intestinal microbiota and damage of antioxidant system in pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Aquaculture*, *495*(June), 940–947. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.065>
- Wang, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., Wang, M., & Wang, L. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the different roles between hepatopancreas and intestine of Litopenaeus vannamei in immune response to aflatoxin B1 (AFB1) challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *222*(April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.006>
- Wang, Z., Tazuin, A. S., Laville, E., Tedesco, P., Létisse, F., Terrapon, N., Lepercq, P., Mercade, M., & Potocki-Veronese, G. (2020). Harvesting of Prebiotic Fructooligosaccharides by Nonbeneficial Human Gut Bacteria. *MSphere*, *5*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1128/msphere.00771-19>
- Warth, B., Braun, D., Ezekiel, C. N., Turner, P. C., Degen, G. H., & Marko, D. (2016). Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. *Chemical Research in Toxicology*, *29*(7), 1087–1097. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00125>
- Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L., & Warhurst, G. (2005). Interferon- γ selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *Journal of Cell Science*, *118*(22), 5221–5230. <https://doi.org/10.1242/jcs.02630>
- Weekley, L. B., Sherertz, P. C., Kimbrough, T. D., & Llewellyn, G. C. (1989). Altered

- bacterial culture density following exposure to aflatoxins. *Journal of Industrial Microbiology*, 4(4), 275–278. <https://doi.org/10.1007/BF01577350>
- Wegorzewska, M. M., Glowacki, R. W. P., Hsieh, S. A., Donermeyer, D. L., Hickey, C. A., Horvath, S. C., Martens, E. C., Stappenbeck, T. S., & Allen, P. M. (2019). Diet modulates colonic T cell responses by regulating the expression of a *Bacteroides thetaiotaomicron* antigen. *Science Immunology*, 4(32). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau9079>
- Wexler, A., & Goodman, A. (2017, November 9). An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>
- Wielen, P., Lipman, L., Knapen, F., & Biesterveld, S. (2002). Competitive Exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a Sequencing Fed-Batch Culture. In *British Poultry Science* (Vol. 43, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/0007166022000004453>
- Wielen, P., Rovers, G., Scheepens, J., & Biesterveld, S. (2002). *Clostridium lactatifermentans* sp. nov., a lactate-fermenting anaerobe isolated from the caeca of a chicken. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 921–925.
- Wild, C., Miller, D. J., & Groopman, J. (2015). Human exposure to aflatoxins and fumonisins. In *Mycotoxin control in low- and middle-income countries*. e International Agency for Research on Cancer.
- Worth, C. (2020). *The Human Gut Microbiome A Focus on Health and Disease with Relevance to Neuropsychiatric Disorders*.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M. L., Bouet, S., Chevalier-Curt, M. J., Robert, V., Philippe, C., Bridonneau, C., Cherbuy, C., Robbe-Masselot, C., Langella, P., & Thomas, M. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-61>
- Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Sun, N., Zhao, Y., Dan, Y., Pan, K., Jing, B., & Ni, X. (2020). Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 Promotes Growth Performance, Intestinal Immunity, and Gut Microbiota in Piglets. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 184–193. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9511-y>
- Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A., Tsuda, M., Hachimura, S., Takahashi, Y., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, K., & Kaminogawa, S. (2009). *Bacteroides* induce higher iga production than *lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in b cells in murine peyer's patches. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(2), 372–377. <https://doi.org/10.1271/bbb.80612>
- Yang, J., McDowell, A., Kim, E. K., Seo, H., Lee, W. H., Moon, C. M., Kym, S. M., Lee, D. H., Park, Y. S., Jee, Y. K., & Kim, Y. K. (2019). Development of a colorectal cancer

- diagnostic model and dietary risk assessment through gut microbiome analysis. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(10). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0313-4>
- Yang, J. Y., Lee, Y. S., Kim, Y., Lee, S. H., Ryu, S., Fukuda, S., Hase, K., Yang, C. S., Lim, H. S., Kim, M. S., Kim, H. M., Ahn, S. H., Kwon, B. E., Ko, H. J., & Kweon, M. N. (2017). Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice. *Mucosal Immunology*, 10(1), 104–116. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.42>
- Yang, X., Liu, L., Chen, J., & Xiao, A. (2017). Response of intestinal bacterial flora to the long-term feeding of aflatoxin B1 (AFB1) in mice. *Toxins*, 9(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/toxins9100317>
- Yin, H., Jiang, M., Peng, X., Cui, H., Zhou, Y., He, M., Zuo, Z., Ouyang, P., Fan, J., & Fang, J. (2016). The molecular mechanism of G2/M cell cycle arrest induced by AFB1 in the jejunum. *Oncotarget*, 7(24), 35592–35606. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9594>
- Zafar, H., & Saier, M. H. (2021). Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>
- Zagato, E., Pozzi, C., Bertocchi, A., Schioppa, T., Saccheri, F., Guglietta, S., Fosso, B., Melocchi, L., Nizzoli, G., & Troisi, J. (2020). *Endogenous murine microbiota member Faecalibaculum rodentium and its human homolog protect from intestinal tumor growth*. 5(3), 511–524. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0649-5>.Endogenous
- Zhang, J., Zheng, N., Liu, J., Li, F. D., Li, S. L., & Wang, J. Q. (2015). Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.020>
- Zhang, M., Chekan, J. R., Dodd, D., Hong, P. Y., Radlinsk, L., Revindran, V., Nair, S. K., Mackie, R. I., & Cann, I. (2014). Xylan utilization in human gut commensal bacteria is orchestrated by unique modular organization of polysaccharide-degrading enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1406156111>
- Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Shan, A., & Xu, L. (2020). Changes in intestinal barrier functions and gut microbiota in rats exposed to zearalenone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111072>
- Zhou, J., Tang, L., & Wang, J. S. (2019). Assessment of the adverse impacts of aflatoxin B1 on gut-microbiota dependent metabolism in F344 rats. *Chemosphere*, 217, 618–628. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.044>
- Zhou, J., Tang, L., Wang, J., & Wang, J. S. (2018). Aflatoxin B1 disrupts gut-microbial metabolisms of short-chain fatty acids, long-chain fatty acids, and bile acids in male F344 rats. *Toxicological Sciences*, 164(2), 453–464. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy102>

Zocco, M. A., Ainora, M. E., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2007). Bacteroides thetaiotaomicron in the gut: Molecular aspects of their interaction. *Digestive and Liver Disease*, 39(8), 707–712. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.04.003>