

**Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo**

**Influência da microbiota intestinal e de fatores
genéticos do hospedeiro sobre os efeitos da
administração de probiótico na prevenção da asma
alérgica experimental**

Mateus Barbosa Casaro

**Trabalho apresentado à disciplina
Trabalho de Conclusão Curso II – 0060029,
como requisito parcial para a graduação
no Curso de Nutrição**

Orientador: Caroline Marcantonio Ferreira



São Paulo

2020

Influência da microbiota intestinal e de fatores genéticos do hospedeiro sobre os efeitos da administração de probiótico na prevenção da asma alérgica experimental

Mateus Barbosa Casaro

**Trabalho apresentado à disciplina
Trabalho de Conclusão Curso II – 0060029,
como requisito parcial para a graduação
no Curso de Nutrição**

Orientador: Caroline Marcantonio Ferreira

São Paulo

2020

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marize e Laerte, e à minha irmã Isabela pelo apoio e paciência em toda minha trajetória da Graduação e da vida.

Ao meu marido Expedito pelo suporte e incentivo em todos os momentos, e por sempre me inspirar nesta jornada.

À minha orientadora Profa. Dra. Caroline M. Ferreira por ter me proporcionado ingressar na vida acadêmica e permitido desenvolver tantos projetos. Obrigado por todas oportunidades, ensinamentos e conselhos ao longo desses 5 anos.

Ao grupo de pesquisa MIAVA, em especial aos meus colegas de laboratório Eduardo Mendes, Willian Ribeiro, Claudio Fukumori e Leila Coelho pela ajuda nos experimentos e por todo companheirismo no dia a dia.

Aos professores Dr. Rui Curi e Dra. Silvana A. Bordin pelo espaço no laboratório e biotério que tornou possível grande parte do desenvolvimento deste projeto.

Aos órgãos de fomento FAPESP (Processos 12/50410-8 e 16/13496-2) e CNPq que investiram neste projeto.

Casaro, MC. Influência da microbiota intestinal e de fatores genéticos do hospedeiro sobre os efeitos da administração de probiótico na prevenção da asma alérgica experimental [Trabalho de Conclusão Curso – Curso de Graduação em Nutrição]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2020.

RESUMO

A asma alérgica constitui um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Os diferentes fenótipos da doença podem ser influenciados pela interação entre a microbiota intestinal e a genética do hospedeiro. Muitas estratégias são investigadas para modular a composição da microbiota, a fim de prevenir ou minimizar os efeitos da doença, como a suplementação com probióticos. Entretanto, os estudos ainda não são conclusivos sobre os efeitos dos probióticos em doenças alérgicas, devido a complexa interação entre fatores ambientais, composição da microbiota e *background* genético do indivíduo. Nosso objetivo é investigar se a diversidade da microbiota intestinal e fatores genéticos do hospedeiro influenciam os efeitos da administração oral de um probiótico (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}) na inflamação alérgica experimental das vias aéreas induzida por ovoalbumina (OVA) em duas linhagens de camundongos. Para tanto, usamos duas linhagens de camundongos, A/J e C57BL/6 (B6). Camundongos A/J apresentam uma maior predisposição para desenvolver respostas alérgicas do que B6. Os resultados, desse estudo indicam que o tratamento com probiótico apresenta efeitos distintos sobre a asma experimental em cada linhagem de camundongo. Além disso, a composição da microbiota intestinal de cada linhagem de camundongo parece influenciar nos efeitos do probiótico.

Descritores: Microbiota intestinal, probiótico, asma, inflamação

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. ASMA.....	5
1.2. MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL	6
1.3. RELAÇÃO DA ASMA COM FATORES AMBIENTAIS E GENÉTICOS	6
1.4. RELAÇÃO DA ASMA COM A MICROBIOTA INTESTINAL	7
1.5. MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA E USO DE PROBIÓTICOS NA PREVENÇÃO DA ASMA	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
A) Investigar se a administração de <i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A} influencia a asma experimental alérgica (células inflamatórias, produção de muco, citocinas e anticorpos) e função pulmonar em duas linhagens de camundongos (A/J e C57BL/6). Investigar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	10
B) Investigar a composição da microbiota intestinal dos camundongos suplementados com probiótico e salina, antes da indução da asma experimental alérgica	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. DECLARAÇÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	11
3.2. ANIMAIS	11
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS	11
3.4. ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO.....	12
3.5. MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL	12
3.6. ADMINISTRAÇÃO DE ACETATO	13
3.7. LAVADO BROCO ALVEOLAR (LBA)	13
3.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	13
3.9. MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	14
3.10. MENSURAÇÃO DE IGG1, IGG2A E IGE ESPECÍFICA A OVA	14
3.11. ANÁLISE DA FUNÇÃO PULMONAR	14
3.12. ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL.....	15
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4. RESULTADOS.....	18
Os resultados serão publicados em revista científica da área.....	18
5. REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASMA

A asma é considerada uma das principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Estima-se que a doença acomete cerca de 339 milhões de pessoas em todo o mundo (1). De acordo com as estimativas da OMS, a doença foi responsável por 418 mil mortes em 2016. No Brasil, a asma constitui um importante problema de saúde pública, representando a quarta maior causa de internações pelo SUS. Em 2013, foram 120 mil hospitalizações por asma, de acordo com o DATASUS, gerando um custo de USD170 milhões ao sistema público de saúde (2).

A asma é caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas com gravidade heterogênea e complexa capacidade de resposta aos tratamentos existentes (3). Uma abordagem estabelecida para o tratamento da asma tem sido agrupar pacientes nos chamados ‘fenótipos’, definidos como características observáveis que resultam de uma combinação de influências hereditárias e ambientais (4).

Existem vários fenótipos da doença, sendo que o mais predominante é o fenótipo alérgico, caracterizado pela inflamação T_H2 . Este fenótipo, conhecido como asma alérgica eosinofílica, é desencadeado devido a presença de um antígeno (pólen, ácaros, fungos, etc) nas vias aéreas, o qual é reconhecido por células dendríticas e leva a ativação de linfócitos T-naive em linfócitos T_H2 (5). Após a ativação, o linfócito T_H2 secreta interleucina (IL) 4, que induz a produção de IgE por linfócitos B, IL-5 que estimula a maturação e liberação de eosinófilos da medula óssea e seu recrutamento para as vias aéreas e IL-13 que é envolvida na produção de muco e hiper-reatividade brônquica (constrição exacerbada da musculatura lisa dos brônquios) (5). Há ainda, o envolvimento de outras células e citocinas neste mecanismo, como as células linfoides inatas (ILC2), IL-25, IL-33, IL-9, assim como outros mediadores inflamatórios liberados por mastócitos ativados por IgE, como as histaminas, leucotrienos, prostaglandinas e TNF, envolvidos na reação alérgica. Há também a diminuição de algumas citocinas que estão envolvidas com o agravo da doença, como por exemplo a IL-10 e TGF- β , secretados por linfócitos T-reguladores (Treg), as quais possuem um papel regulador na inflamação (3, 5).

Dentre as regulações que acontecem na asma alérgica, ocorre a resposta T_H1 , outro tipo de resposta imunológica com atuação de citocinas IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- β . A secreção de IFN- γ desencadeia a produção de IgG2a e inibição da resposta T_H2 . Enquanto a secreção de IL-4 desencadeia a produção de IgG1 pelos linfócitos B, inibindo a resposta T_H1 (6). Dessa forma, tais anticorpos podem ser utilizados como marcadores dos balanços entre as respostas imunológicas.

Não há cura para a asma, porém existem tratamentos que podem controlá-la e proporcionar uma melhor qualidade de vida para o paciente (7). Esses tratamentos medicamentosos podem ser constituídos por corticoides sistêmicos, corticoides inalatórios, antialérgicos e anti-inflamatórios não-esteroidais. Tais medicamentos apresentam efeitos adversos, como desde uma simples rouquidão à supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal (8). Além disso, por ser uma doença heterogênea e de mecanismos complexos, normalmente é necessário fazer a combinação de dois ou mais medicamentos para o tratamento da asma.

1.2. MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL

O modelo de asma alérgica experimental tem contribuído para o entendimento da doença nas últimas décadas (9, 10). Experimentalmente é possível mimetizar uma inflamação pulmonar através da utilização de vários antígenos, sendo o mais tradicional o uso de da proteína *ovalbumin* (OVA). O modelo de indução normalmente é constituído por sensibilizações e desafios com o antígeno. No modelo que será utilizado neste projeto, a OVA será aplicada intraperitonealmente no animal para sensibilizar seu sistema imunológico, juntamente com hidróxido de alumínio, o qual é utilizado como coadjuvante e indutor de resposta T_H2 (11). Após o processo de imunização, é realizado o desafio, em que somente a OVA é diluída em solução salina e aplicada por via intranasal e intratraqueal, de modo a atingir diretamente o trato respiratório e provocar a resposta desejada.

1.3. RELAÇÃO DA ASMA COM FATORES AMBIENTAIS E GENÉTICOS

No final da década de 90, pesquisadores usaram diferentes linhagens consanguíneas de camundongos sob os mesmos ambientes controlados como uma oportunidade para estimar a influência do *background* genético sobre fenótipo de inflamação alérgica das vias aéreas (12-14); por exemplo, algumas linhagens de

camundongos, como camundongos A/J, mostraram maior eosinofilia após 24 h de desafio com OVA do que outras linhagens de camundongos, como camundongos C57BL/6 (15, 16). Estudos clínicos e em animais, considerando a relevância da genética do hospedeiro para a asma, indicaram claramente que as interações gene-ambiente estão envolvidas na manifestação desse complexo distúrbio (17, 18).

Vários fatores ambientais estão relacionados com o desenvolvimento da asma, como o modo de parto (cesariano ou vaginal), hábitos alimentares, nutrição, uso de antibióticos e medicamentos (19). Curiosamente, além dos genes hospedeiros e do meio ambiente, um desequilíbrio de microrganismos no intestino e no pulmão tem sido cada vez mais associado à incidência e gravidade da asma (20-23).

1.4. RELAÇÃO DA ASMA COM A MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal pode ser definida como o conjunto de microrganismos (bactérias, fungos e vírus) comensais que colonizam e residem no trato gastrointestinal humano e de outros animais (24). É uma complexa comunidade microbiana que interage com o hospedeiro através do processo de simbiose, comensalismo e patogenicidade (25). Cada vez mais a literatura científica mostra a importância das interações simbióticas entre a microbiota e hospedeiro para a homeostase do metabolismo. Esta interação se baseia na capacidade metabólica, na digestão de alimentos e na modulação do sistema imunológico.

A colonização da comunidade microbiana se inicia com o parto e aleitamento, e a composição se estabelece nos primeiros anos de uma criança, a qual persistirá durante a vida adulta. Os padrões de alimentação infantil é um importante fator que influencia na colonização microbiana (26). Estudos descobriram que a composição da microbiota intestinal entre bebês que desenvolveram ou não inflamação alérgica é diferente: *Clostridia* é relacionado a bebês asmáticos e *Bifidobacteria* a não-asmáticos (27). Bebês que possuíam altos níveis de *Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium* e *Rothia* em suas fezes aos 3 meses de idade desenvolveram sintomas precoces de asma ou alergia (27). Recentemente, um estudo mostrou que a alta diversidade bacteriana no intestino no início da vida pode diminuir o risco de desenvolvimento de asma aos 7 anos de idade (28). A diversidade dessa microbiota também é influenciada

por fatores intrínsecos (genética, idade, condições de saúde) e extrínsecos (alimentação, estilo de vida, medicamentos) do indivíduo. Perturbações nessa composição levam à disbiose e podem resultar em consequências para a saúde a longo prazo (29).

Em 1989, através de estudos epidemiológicos, foi observada uma menor prevalência de alergias em crianças que tiveram infecções durante a primeira infância, o qual estaria associada a hábitos “não higiênicos”, e então foi proposta a “Hipótese da Higiene” (30). Esta hipótese foi ampliada para a “hipótese da microflora”, a qual propõe que a incidência de algumas doenças está relacionada a composição da microbiota intestinal e sua influência no sistema imunológico (31, 32). Baseado nessas evidências, o cenário científico atual comprova que a microbiota intestinal está diretamente relacionada com o desenvolvimento, maturação e modulação do sistema imunológico. Ainda não totalmente compreendida, esta relação estreita entre a microbiota intestinal e doenças alérgicas é estabelecida, entre outros fatores, através de sua função imunomoduladora, promovendo um equilíbrio ou desequilíbrio entre respostas imunológicas Th1 e Th2.

1.5. MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA E USO DE PROBIÓTICOS NA PREVENÇÃO DA ASMA

Considerando a importância da microbiota intestinal, muitas estratégias são investigadas para modular sua composição, como a suplementação com probióticos. Probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”. E para isso precisam ter sua linhagem identificada, isolada e caracterizada adequadamente em relação a quantidade, estabilidade e efeitos desejados (33, 34). Os principais microrganismos classificados, estudados e vendidos pela indústria como probióticos são cepas de lactobacilos e bifidobactérias. Nesse presente estudo iremos utilizar uma específica cepa de probiótico *Bifidobacterium longum* 5^{1A}.

A literatura científica tem proporcionado importantes avanços neste entendimento, no entanto, não há consenso se a suplementação com probióticos pode prevenir ou atenuar doenças alérgicas. Embora vários estudos tenham demonstrado a capacidade de determinados probióticos em prevenir e tratar doenças atópicas e

alérgicas (35-38), há também estudos com efeitos inconscientes. A suplementação com *Lactobacillus* GG durante a gravidez e primeira infância foi associada a um aumento da taxa de episódios de bronquite sibilante em um estudo prospectivo controlado (39). Outro ensaio clínico randomizado e controlado com uma população de alto risco de desenvolver doenças alérgicas, a suplementação nos primeiros 6 meses de vida com *L. acidophilus* não reduziu o risco de dermatite atópica e foi associada a um aumento da sensibilização ao alérgeno nos bebês (40).

Há vários fatores que podem explicar essas divergências de resultados e respostas clínicas entre os estudos, principalmente devido aos diferentes protocolos, cepas, doses e duração das intervenções probióticas utilizadas. Em estudos clínicos, os participantes possuem características (imunidade, genética, estilo de vida e alimentação) diferentes, que podem interferir no tratamento com probióticos, resultando em resultados divergentes. Estudos experimentais também geralmente usam distintas espécies probióticas em diferentes linhagens de camundongos e usam vários protocolos para induzir a inflamação alérgica de maneira não comparativa, e todos esses fatores dificultam a obtenção de conclusões sobre os efeitos probióticos (41, 42).

Há vários mecanismos propostos para explicar os meios pelos quais os probióticos podem prevenir doenças alérgicas. O mais estudado é a sua capacidade de desenvolver tolerância da mucosa e sistêmica, regulando a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias. Por exemplo, através da indução de células T reguladoras (+), aumentando os níveis de IL-10 e inibindo a produção exacerbada de citocinas Th2, alterando o equilíbrio Th1/Th2 em direção a Th1 (43, 44). Um mecanismo proposto para explicar este efeito imunomodulador é a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) – acetato, propionato, butirato – pela bactéria, resultado da fermentação de fibras na região do colón. A *B. longum* 5^{1A} é produtora de acetato e demonstrou efeito preventivo da exacerbação da asma experimental induzido por OVA em modelo de camundongos Balb/c ovariectomizadas (41). Em camundongos Balb/c adultos, a *B. longum* AH1206 demonstrou atenuar respostas alérgicas, com aumento de linfócitos T-reguladores (T_{reg}) no tecido pulmonar (45);

Considerando que aproximadamente 3,9 milhões de adultos nos EUA consomem suplementos prebióticos ou probióticos (46) e que alguns estudos

relataram até morbimortalidade associada a probióticos (47, 48), estudos adicionais sobre esse tópico são necessários.

Cada vez mais as pessoas com asma têm adotado o consumo de probióticos na tentativa de reduzir os sintomas alérgicos devido a seus efeitos anti-inflamatórios. Portanto, é relevante entender as interações probiótico-hospedeiro ou interações microbiota-hospedeiro para uma melhor manipulação deste tratamento. Dessa forma, projetamos um experimento para investigar o papel de probióticos específicos em dois hospedeiros diferentes, camundongos A/J e B6 e qual a relevância da diversidade da microbiota intestinal para asma alérgica experimental. Compreender a relevância das interações probiótico-hospedeiro pode chamar a atenção para o uso indiscriminado de produtos probióticos por consumidores asmáticos.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar as contribuições da diversidade da microbiota intestinal e de fatores genéticos do hospedeiro sobre o efeito da administração oral de um probiótico (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}) na inflamação alérgica das vias aéreas em duas linhagens distintas de camundongos (A/J e C57BL/6).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Investigar se a administração de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} influencia a asma experimental alérgica (células inflamatórias, produção de muco, citocinas e anticorpos) e função pulmonar em duas linhagens de camundongos (A/J e C57BL/6). Investigar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).
- B) Investigar a composição da microbiota intestinal dos camundongos suplementados com probiótico e salina, antes da indução da asma experimental alérgica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DECLARAÇÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

Os experimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) sob número 181 nas fls. 114 do livro 2. Além disso, os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia para o uso de animais de laboratório do *National Institutes of Health (NIH)*.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos A/J e C57BL/6J provenientes do Biotério de Imunologia do ICB-USP. Os camundongos foram alojados em condições livres de patógenos (SPF), sob ciclo claro/escuro de 12 horas, em condições padrão de alimento e água *ad libitum*. Todos os camundongos utilizados foram pareados por idade (5 semanas de idade no início dos experimentos) e alimentados com uma ração padrão AIN93-M irradiada (49).

3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

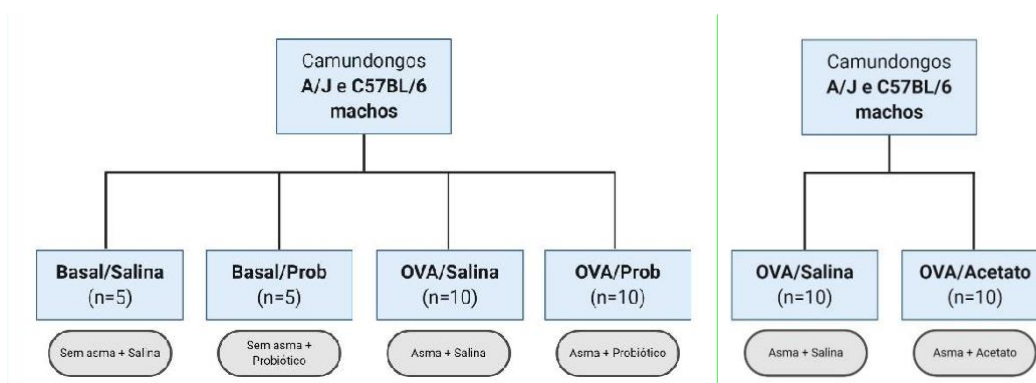


Figura 1: Grupos experimentais

Os experimentos foram realizados em duas etapas. No primeiro experimento (suplementação com probiótico) os camundongos foram separados em quatro grupos: dois grupos basais, ou seja, sem indução de asma, tratado e não tratado com probiótico; e dois grupos alérgicos (OVA), com indução de asma, tratado e não tratado com probiótico. No segundo experimento (administração com acetato) os

camundongos foram separados apenas em dois grupos alérgicos (OVA), tratado e não tratado com acetato.

3.4. ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO

A espécie de bifidobactéria (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}) utilizada neste estudo foi isolada e caracterizada no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (50). As bifidobactérias foram isoladas de fezes de crianças saudáveis de até 5 anos de idade na cidade de Salvador (Bahia, Brasil) e identificadas por testes morfológico, respiratório e bioquímico, seguidos por PCR multiplex. As bactérias foram replicadas em meio de caldo MRS (Difco) e cultivadas sob condições anaeróbicas em um frasco anaeróbico a 37°C sem agitação por 48 h.

Para a administração probiótica de *B. longum* 5^{1A}, os camundongos receberam um inóculo diário por gavagem de 0,1 mL contendo 10⁸ células bacterianas, iniciando 15 dias antes da primeira sensibilização até o último desafio (Figura 2). Um grupo controle recebeu uma solução salina de tampão fosfato (PBS) por gavagem. A *B. longum* 5^{1A} inativada pelo calor foi preparada esquentando alíquotas de suspensões viáveis de bactérias por 20 minutos a 80° C. Bactérias inativadas foram administradas como descrito acima para bactérias vivas.

3.5. MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL

Para a indução da inflamação alérgica das vias aéreas (Figura 2), os camundongos foram sensibilizados pela via intraperitoneal (ip) com 50 µg de ovalbumina (OVA) grau V (Sigma Chemical Co., EUA), absorvidos a 1 mg em 200 µl de PBS estéril e 1,6 mg de *Inject Alum* (Thermo Scientific, EUA) nos dias 0 e 7. No dia 14, os camundongos foram desafiados com 10 µg de OVA em 20 µl de PBS estéril intranasal (i.n.) e nos dias 21 e 22 com 20 µg de OVA em 30 µl de PBS estéril intratraqueal (i.t.). Todas as análises foram realizadas 24 horas após o último desafio (51).

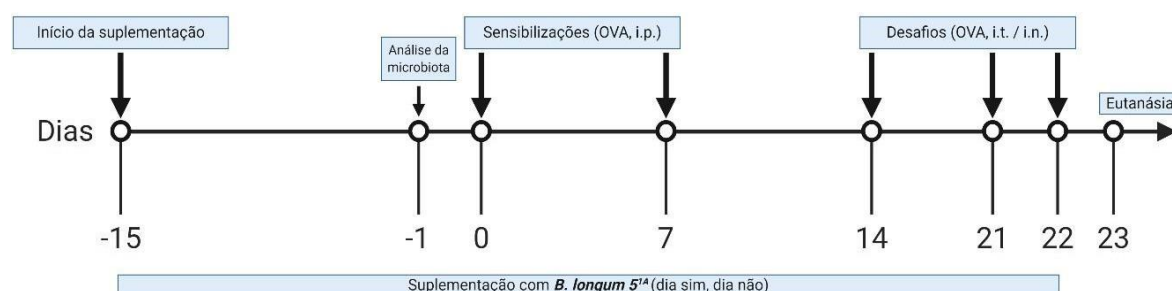


Figura 2: Delineamento experimental

3.6. ADMINISTRAÇÃO DE ACETATO

Neste experimento, os camundongos receberam solução salina (PBS estéril) como controle ou acetato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS estéril por 15 dias antes de serem expostos a OVA e foram tratados durante toda a duração do experimento por injeção intraperitoneal dia sim, dia não. A dose utilizada foi de 1g de acetato por kg de peso corporal (52).

3.7. LAVADO BROCO ALVEOLAR (LBA)

Após a eutanásia, a traqueia do camundongo foi exposta e uma cânula foi inserida. Os pulmões foram lavados duas vezes com alíquotas (0,8 mL cada) de PBS injetadas através da cânula. O número total de células no lavado bronco alveolar (BAL) foi contado usando um contador automático de células Countess® (Invitrogen). Em seguida, o BAL foi centrifugado a 1200x rpm por 1 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para análise de citocinas. As células foram ressuspensas em $5,0 \times 10^5$ células / mL. A contagem diferencial de células foi preparada a partir de alíquotas de BAL (200 µL) centrifugadas a 600 rpm por 5 min, utilizando citocentrífuga (Fanem, Brasil). As células foram coradas com Instant Prov (Newprov, Brasil), e um total de 300 células foram contadas para determinar a proporção de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares usando critérios morfológicos padrão.

3.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica foi realizada em amostras de pulmões dos grupos OVA/Salina, OVA/Probiótico e OVA/Acetato. Para avaliar as alterações patológicas, os pulmões foram removidos dos camundongos após retirada do LBA e fixados por

imersão em paraformaldeído a 4%. Os lobos foram seccionados sagitalmente, embebidos em parafina, cortados em seções de 5 µm e corados com ácido periódico Schiff (PAS).

3.9. MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Para os níveis de citocinas, foram coletadas amostras de LBA dos camundongos, centrifugadas a 1200x rpm por 5 min e o sobrenadante armazenado a -80 °C para análise. As concentrações de citocinas IL-4 e IFN-γ foram mensuradas usando o kit comercial para ELISA (BD Biosciences) de acordo com a instruções do fabricante. As determinações foram realizadas em duplicata.

3.10. MENSURAÇÃO DE IGG1, IGG2A E IGE ESPECÍFICOS A OVA

As placas foram revestidas com solução de OVA a 5 µg / mL em tampão carbonato (pH 9,5) a 4 ° C durante a noite. As placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween-20) e bloqueadas com tampão de ensaio (PBS contendo 10% de soro fetal de bovino inativado por calor) por 1 h à temperatura ambiente (RT). As amostras de soro dos camundongos foram então diluídas no diluente de ensaio na proporção de 1:1000 (v / v) e adicionadas às placas seguidas de uma incubação de 2h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase foi adicionado, anti-IgG1-HRP (GeneTex, EUA) diluído na proporção de 1:20.000 (v / v) no diluente de ensaio ou anti-IgG2a-HRP (GeneTex, EUA) diluído em 1:5000 (v / v), e incubados por 1 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e foi adicionado o substrato TMB (BD Biosciences) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi parada por adição de ácido sulfúrico 2N. A absorbância foi adquirida a 450 nm. Os valores foram considerados após a subtração da absorbância de um poço sem adição de soro (incubado apenas com o diluente do ensaio). Os resultados são apresentados em unidades de densidade óptica (D.O.) e a razão foi calculada dividindo os respectivos valores. Adaptado de *Koga et al., 2016* (53). As concentrações de IgE específicas do OVA foram testadas pelo kit ELISA de acordo com o fabricante (Cayman Chemical).

3.11. ANÁLISE DA FUNÇÃO PULMONAR

Todos os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg / kg, i.p.) e xilazina (20 mg / kg) e paralisados com brometo de pancurônio, mantendo-se uma profundidade anestésica estável (54). Após a traqueostomia, a traqueia foi canulada com um tubo metálico de calibre 18, e o mouse foi ventilado com um ventilador para pequenos animais controlado por computador (flexiVent; SCIREQ, Canadá) usando um volume corrente de 10 mL / kg e uma frequência respiratória de 150 respirações/min. Uma pressão expiratória final positiva (PEEP) de 2 cm H₂O foi aplicada por toda parte. Uma veia jugular externa foi isolada para uma infusão intravenosa (i.v.) de metacolina (MCh). No início, 6 µg de MCh foram fornecidos por via intravenosa para garantir que o animal fosse realmente responsivo ao MCh e que a resistência das vias aéreas retornasse ao valor basal após seu aumento induzido pelo MCh, o que indicava que o animal estava em condição fisiológica estável. Para obter uma curva dose-resposta, MCh foi injetada a partir de uma dose de 4 µg (solução de 200 µg / mL em PBS; bolus i.v. de 10-40 µL). Antes de cada dose de MCh, o trajeto expiratório era obstruído por 15 s para produzir uma inflação profunda. A ventilação foi continuada por aproximadamente 2 minutos entre doses consecutivas de MCh. A responsividade das vias aéreas foi igual à resistência newtoniana (R_n) (54).

3.12. ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL

As amostras fecais foram coletadas um dia antes da sensibilização com OVA; os *pellets* foram coletados em fluxo laminar e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e estocados em a -80°C até o dia da extração de DNA. O DNA foi extraído usando-se o kit MoBio PowerSoil conforme as instruções do fabricante e quantificado usando o espectrofotômetro Qubit (Thermo Scientific Technologies). A análise de microbioma foi feita segundo Thomas et al., 2016. Em resumo, foi feito à amplificação da região V4-V5 do gene da subunidade 16S do rRNA usando o iniciador 5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3' e reverso 5'-CCGTCAATTCNTTTRAGTTT-3', correspondente as posições 562 e 906, respectivamente, do gene 16S rRNA de *Escherichia coli*. As amostras foram amplificadas por PCR usando 2,5µM de cada iniciador, 10 µL de Kapa Hotstart High Fidelity Master Mix (Kapa Technologies) e 25ng do DNA genômico extraído. As condições foram 95°C, 3 min; 98°C, 15 s; e 40°C, 30 s por 35 ciclos. O produto amplificado foi aplicado em um gel de agarose 3% e, por eletroforese em gel, as bandas correspondentes ao tamanho do *amplicon* de interesse foram cortadas usando-se lâminas estéreis de bisturi descartáveis. O fragmento de

gel foi purificado usando o kit de extração de gel QIAquick (Qiagen) para remover artefatos, dímeros e bandas não específicas. Os *amplicons* tiveram sua extremidade reparada e ligada a adaptadores Ion Plus Torrent identificados com barcodes Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Scientific). Quantidades equimolares dos amplicons identificados foram aliquotadas usando o kit de quantificação Ion Torrent qPCR (Thermo Scientific) e colocados em um só *pool* que prosseguiu para a amplificação por PCR em emulsão usando o kit Ion PGM Template OT2 400 (Thermo Scientific). As amostras foram sequenciadas usando a plataforma Ion torrent PGM com chip v2 e Ion PGM Sequencing 400 Kit (Thermo Scientific). As sequências foram processadas pela última versão do servidor Ion Torrent e usadas no pacote de softwares *Qiime* (*Quantitative insights into microbial ecology*) (V. 1.6.0) (CAPORASO et al., 2010). Removemos as sequências com índice de qualidade inferior a 20, usando um intervalo de 50nt. Identificamos as amostras através do *barcode* permitindo no máximo 2 descasamentos e descartamos sequencias não identificadas, inferiores a 200nt ou acima de 500nt depois da remoção do *barcode*. Os iniciadores do PCR foram identificados nas extremidades da leitura, permitindo no máximo 4 descasamentos, e foram removidos, assim como sequências com iniciadores não identificáveis. Após removermos todas as sequencias abaixo de 200nt, as sequências remanescentes seguiram para análise posterior. Assim, foram filtradas e agrupadas em *clusters* com 97% de identidade usando UPARSE (implementado em USEARCH v7 – EDGAR, 2013) e a sequência semente identificada em cada *cluster* foi usada como representativa do mesmo. Sequências e *clusters* quiméricos foram identificados usando UCHIME (EDGAR et al., 2011) e o banco de dados de sequencias quiméricas do Broad Institute (version microbiomeutil-r20110519), e foram excluídas da análise. Usando a interface do *Qiime* com parâmetros padrões, o classificador RDP foi usado para classificar taxonomicamente cada sequência, com no mínimo 80% de intervalo de confiança e, subsequentemente, para cada unidade taxonômica operacional. OTUs que ocorreram em menos de 25% de todas amostras e com menos de 3 leituras não foram consideradas. Usando o *Qiime*, fizemos a rarefação das OTUs com uma profundidade de 4,790 sequencias para calcular a riqueza de OTUs e a diversidade filogenética usando o número total de OTUs observados e a diversidade filogenética de Faith (FAITH et al., 2009). Para a análise de beta-diversidade, sequências representativas das OTUs foram alinhadas usando o software *PyNAST*(CAPORASO

et al., 2010) contra um conjunto de sequencias 16S alinhadas do *Green Genes* com parâmetros padrões e os alinhamentos foram filtrados para montar uma árvore filogenética usando o software *FastTree* (PRICE et al., 2009)pr. As distâncias entre as comunidades foram calculadas por 4 métricas; *unweighted* e *weighted UniFrac* Bray–Curtis e Euclideana.

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi realizada com o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, US). Os dados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). Teste t de Student e ANOVA foram empregados para comparações entre 2, 3 ou mais grupos, respectivamente. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

OS RESULTADOS SERÃO PUBLICADOS EM REVISTA CIENTÍFICA DA ÁREA.

5. REFERÊNCIAS

1. Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-59.
2. Cardoso TA, Roncada C, Silva ERD, Pinto LA, Jones MH, Stein RT, et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2017;43(3):163-8.
3. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15025.
4. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008;372(9643):1107-19.
5. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nature immunology*. 2015;16(1):45-56.
6. Mountford AP, Fisher A, Wilson RA. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunology*. 1994;16(10):521-7.
7. Bergmann KC. [Bronchial asthma - many types, different therapies]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2016;141(10):687-92.
8. Anderson WC, 3rd, Apter AJ, Dutmer CM, Searing DA, Szeffler SJ. Advances in asthma in 2016: Designing individualized approaches to management. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(3):671-80.
9. Boyce JA, Austen KF. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(12):1869-73.
10. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & mechanisms*. 2008;1(4-5):213-20.
11. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(2):477-88.
12. Wills-Karp M, Ewart SL. The genetics of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(4 Pt 2):S89-96.
13. Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, Chi EY, Henderson WR, Jr., Lewis DB. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(2):661-9.
14. Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(1):L32-42.
15. De Sanctis GT, Merchant M, Beier DR, Dredge RD, Grobholz JK, Martin TR, et al. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nature genetics*. 1995;11(2):150-4.
16. Ewart SL, Kuperman D, Schadt E, Tankersley C, Grupe A, Shubitowski DM, et al. Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23(4):537-45.

17. Kauffmann F, Demenais F. Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(6):1229-40; quiz 41-2.
18. von Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(1):3-11; quiz 2-3.
19. Ober C, Yao TC. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunological reviews*. 2011;242(1):10-30.
20. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14691-6.
21. Kim YG, Udayanga KG, Totsuka N, Weinberg JB, Nunez G, Shibuya A. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE(2). *Cell host & microbe*. 2014;15(1):95-102.
22. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-6.
23. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*. 2007;56(5):661-7.
24. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
25. Ley RE, Peterson DA, Gordon JL. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.
26. Taylor SN, Basile LA, Ebeling M, Wagner CL. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk versus formula. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*. 2009;4(1):11-5.
27. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO reports*. 2012;13(5):440-7.
28. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Bjorksten B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2014;44(6):842-50.
29. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(5):313-23.
30. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989;299(6710):1259-60.
31. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(4):516-20.
32. Noverr MC, Huffnagle GB. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(12):1511-20.
33. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46 Suppl 2:S58-61; discussion S144-51.

34. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014;11(8):506-14.
35. Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bottcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Bjorksten B, et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(5):1174-80.
36. Miraglia Del Giudice M, Maiello N, Decimo F, Fusco N, B DA, Sullo N, et al. Airways allergic inflammation and *L. reuterii* treatment in asthmatic children. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2012;26(1 Suppl):S35-40.
37. Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao JZ, Yonezawa S, Yaeshima T, Iwatsuki K, et al. Suppressive effects of *Bifidobacterium longum* on the production of Th2-attracting chemokines induced with T cell-antigen-presenting cell interactions. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2009;55(3):324-34.
38. Yu J, Jang SO, Kim BJ, Song YH, Kwon JW, Kang MJ, et al. The Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the Prevention of Asthma in a Murine Model. *Allergy, asthma & immunology research*. 2010;2(3):199-205.
39. Kopp MV, Hennemuth I, Heinzmann A, Urbanek R. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics*. 2008;121(4):e850-6.
40. Taylor AL, Dunstan JA, Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(1):184-91.
41. Mendes E, Acetturi BG, Thomas AM, Martins FDS, Crisma AR, Murata G, et al. Prophylactic Supplementation of *Bifidobacterium longum* 5(1A) Protects Mice from Ovariectomy-Induced Exacerbated Allergic Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1732.
42. Raftis EJ, Delday MI, Cowie P, McCluskey SM, Singh MD, Ettore A, et al. *Bifidobacterium breve* MRx0004 protects against airway inflammation in a severe asthma model by suppressing both neutrophil and eosinophil lung infiltration. *Scientific reports*. 2018;8(1):12024.
43. Mortaz E, Adcock IM, Folkerts G, Barnes PJ, Paul Vos A, Garssen J. Probiotics in the management of lung diseases. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:751068.
44. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceddia M, et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(5):811-9.
45. MacSharry J, O'Mahony C, Shalaby KH, Sheil B, Karmouty-Quintana H, Shanahan F, et al. Immunomodulatory effects of feeding with *Bifidobacterium longum* on allergen-induced lung inflammation in the mouse. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2012;25(4):325-34.
46. Draper K, Ley C, Parsonnet J. Probiotic guidelines and physician practice: a cross-sectional survey and overview of the literature. *Beneficial microbes*. 2017;8(4):507-19.
47. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;371(9613):651-9.

48. Vogel G. Clinical trials. Deaths prompt a review of experimental probiotic therapy. *Science*. 2008;319(5863):557.
49. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
50. Souza TC, Silva AM, Drews JR, Gomes DA, Vinderola CG, Nicoli JR. In vitro evaluation of Bifidobacterium strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Beneficial microbes*. 2013;4(2):179-86.
51. Casaro MC, Crisma AR, Vieira AT, Silva GHM, Mendes E, Ribeiro WR, et al. Prophylactic Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703 supplementation reduces partially allergic airway disease in Balb/c but not in C57BL/6 mice. *Benef Microbes*. 2018;9(3):465-76.
52. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine*. 2014;20(2):159-66.
53. Koga MM, Bizzarro B, Sa-Nunes A, Rios FJ, Jancar S. Boosting Adaptive Immunity: A New Role for PAFR Antagonists. *Scientific reports*. 2016;6:39146.
54. Ferreira CM, Chen JL, Li J, Shimomura K, Yang X, Lussier YA, et al. Genetic interactions between chromosomes 11 and 18 contribute to airway hyperresponsiveness in mice. *PloS one*. 2012;7(1):e29579.
55. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):18933-8.
56. Vieira AT, Fukumori C, Ferreira CM. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clinical & translational immunology*. 2016;5(6):e87.
57. Sjogren YM, Jenmalm MC, Bottcher MF, Bjorksten B, Sverremark-Ekstrom E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(4):518-26.
58. Vieira AT, Rocha VM, Tavares L, Garcia CC, Teixeira MM, Oliveira SC, et al. Control of Klebsiella pneumoniae pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic Bifidobacterium longum 5(1A). *Microbes and infection*. 2016;18(3):180-9.
59. Guerra PV, Lima LN, Souza TC, Mazochi V, Penna FJ, Silva AM, et al. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. *World journal of gastroenterology*. 2011;17(34):3916-21.
60. Souza TC, Zacarias MF, Silva AM, Binetti A, Reinheimer J, Nicoli JR, et al. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of Bifidobacterium longum 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of applied microbiology*. 2012;112(6):1184-92.
61. Vieira AT, Galvao I, Amaral FA, Teixeira MM, Nicoli JR, Martins FS. Oral treatment with Bifidobacterium longum 51A reduced inflammation in a murine experimental model of gout. *Beneficial microbes*. 2015;6(6):799-806.
62. Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut

homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nature communications*. 2015;6:6734.

63. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. 2011;3(10):858-76.
64. Zhang C, Derrien M, Levenez F, Brazeilles R, Ballal SA, Kim J, et al. Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *The ISME journal*. 2016;10(9):2235-45.
65. Stokholm J, Blaser MJ, Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, Vinding RK, et al. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. *Nature communications*. 2018;9(1):141.
66. Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bjorksten B, Oldaeus G, Jenmalm MC. No effect of probiotics on respiratory allergies: a seven-year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(6):556-61.
67. Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Science translational medicine*. 2015;7(307):307ra152.
68. Derrien M, Collado MC, Ben-Amor K, Salminen S, de Vos WM. The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(5):1646-8.
69. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*. 2017;19(1):29-41.
70. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*. 2013;54(9):2325-40.
71. Png CW, Linden SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(11):2420-8.
72. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016;65(3):426-36.
73. Demirci M, Tokman HB, Uysal HK, Demiryas S, Karakullukcu A, Saribas S, et al. Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma. *Allergologia et immunopathologia*. 2019;47(4):365-71.
74. Negishi Y, Miura M, Saito M, Sano Y, Akiya K, Fujiwara Y. Studies of natural killer activity and augmentation by OK-432 in patients with gynecological malignancies. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1986;21(1):40-6.
75. McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PloS one*. 2013;8(1):e53653.
76. Borges-Canha M, Portela-Cidade JP, Dinis-Ribeiro M, Leite-Moreira AF, Pimentel-Nunes P. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2015;107(11):659-71.
77. Fonseca W, Lucey K, Jang S, Fujimura KE, Rasky A, Ting HA, et al. *Lactobacillus johnsonii* supplementation attenuates respiratory viral infection via metabolic reprogramming and immune cell modulation. *Mucosal immunology*. 2017;10(6):1569-80.

78. Durack J, Kimes NE, Lin DL, Rauch M, McKean M, McCauley K, et al. Delayed gut microbiota development in high-risk for asthma infants is temporarily modifiable by *Lactobacillus* supplementation. *Nature communications*. 2018;9(1):707.