

ESTUDO VISANDO A PRODUÇÃO DE UMA CÁPSULA
PARA TRANSPLANTAÇÃO FECAL: DA SELEÇÃO DE
DOADORES DE FEZES AOS ENSAIOS LABORATORIAIS

ALINE PARISOTO MISSIO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO VISANDO A PRODUÇÃO DE UMA CÁPSULA PARA
TRANSPLANTAÇÃO FECAL: DA SELEÇÃO DE DOADORES DE
FEZES AOS ENSAIOS LABORATORIAIS

Aluna: Aline Parisoto Missio

Orientador: Dr. Josias Rodrigues

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU-SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Missio, Aline Parisoto.

Estudo visando a produção de uma cápsula para
transplantação fecal : da seleção de doadores de fezes aos
ensaios laboratoriais / Aline Parisoto Missio. - Botucatu,
2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Josias Rodrigues

Capes: 20202008

1. Transplante de microbiota fecal. 2. Cápsulas.
3. Fezes - Doadores - Seleção. 4. Testes laboratoriais.

Palavras-chave: Cápsulas; Microbiota fecal; Transplantação
fecal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, por todo o carinho e incentivo a mim dados para continuar a seguir a minha formação acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Josias Rodrigues, por ter confiado na minha capacidade de realização desse trabalho, por sempre ser atencioso e prestativo. Obrigada por me proporcionar desafios que contribuíram para meu crescimento e desenvolvimento acadêmico.

Aos colegas e amigos que fiz no Laboratório de Bacteriologia Médica da Unesp, em especial a Carolina, Larissa e João Pedro. Agradeço pela companhia e auxílio na realização das etapas do projeto.

À Prof. Dr^a. Lígia Yukie Sasaki e ao Prof. Dr. Fernando Romero pela colaboração e suporte oferecidos durante esse tempo de trabalho.

Ao prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior e a Dr^a Camila Dantas Malossi do Instituto de Biotecnologia (IBTec) de Botucatu da UNESP, pelos testes de detecção de SARS-CoV-2 nas fezes.

Ao Setor de Microbiologia e Imunologia do IB pelo apoio na realização do doutorado.

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro para a realização do projeto (Número do projeto: 2018/16972-5).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) por todo o suporte nessa jornada, em especial aos membros da Coordenação e secretários.

À indispensável contribuição da voluntária que se apresentou e foi selecionada para colaborar como doadora de fezes para os estudos aqui apresentados.

E a todos aqueles que eu não mencionei aqui, mas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

Dedico esta tese a Arquimedes e Roberto Néri da Silva Freitas (*in memoriam*).

*“Dou respeito às coisas desimportantes
e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo.
Sou um apanhador de desperdícios:
Amo os restos
como as boas moscas.
Queria que a minha voz tivesse um formato de canto.
Porque eu não sou da informática:
eu sou da invencionática.
Só uso a palavra para compor meus silêncios.”*

O apanhador de desperdícios, Manoel de Barros

RESUMO

Inúmeros estudos apontam a importância da microbiota intestinal na manutenção da homeostase do organismo, de modo que alterações em sua composição de espécies podem estar associadas a causa de várias doenças. Em muitos casos, estas alterações - conhecidas como disbiose - podem ser revertidas pela administração de probióticos, que são microrganismos com algum papel modulador, com efeitos benéficos para além do intestino. Uma estratégia de restauração da normobiose intestinal é a aplicação direta de fezes de indivíduos saudáveis naqueles apresentando algum tipo de patologia associada com disbiose. Esta abordagem, que tem surtido efeito em muitos ensaios clínicos, sendo até mesmo recomendada para doenças como a diarreia por *Clostridioides difficile* refratária à antibioticoterapia, apresenta uma série de desafios, tendo em vista a necessidade de se evitar a transmissão de patógenos intestinais (segurança) e de garantia (eficácia) de restauração da normobiose. Este trabalho teve como propósito explorar pontos que assegurem o alcance destes objetivos, aplicando-os ao formato de transplantação fecal menos invasivo - a cápsula. A primeira etapa do trabalho consistiu na seleção de doadores de fezes, iniciando-se com uma chamada pública que teve alcance nacional, seguida de um processo de seleção, compreendendo uma triagem por entrevista, exames clínicos e laboratoriais para atestar a saúde e ausência de patógenos nas fezes de potenciais candidatos. Após ou em paralelo a esta fase de avaliação do nível de segurança das fezes de interessados em participar do processo de seleção, foi feita a análise do microbioma fecal, para eventualmente atestar sua eficácia. Além de atestar a segurança do candidato para ser um doador, excluindo, por exemplo, aqueles apresentando doenças crônicas, a entrevista permitiu coletar informações que poderiam dificultar ou comprometer a colheita e manutenção da viabilidade microbiana nas fezes. As questões foram divididas em duas categorias: aquelas visando a obtenção de informações de natureza transitória ou aquelas que poderiam comprometer definitivamente a participação do interessado. De um total de 221 candidatos, 196 foram eliminados por apresentarem limitações tais como, diagnóstico de doenças crônicas ou residirem em local impeditivo de realização de colheita (fora da cidade de Botucatu). Aos 25 candidatos que passaram na triagem da entrevista, foi solicitado o encaminhamento para os exames laboratoriais preliminares. Destes, 11 desistiram do processo de seleção e 6 foram desqualificados, por terem se mudado de Botucatu. Os oito remanescentes incluíram 2 que vieram a se mudar de Botucatu, nesta etapa, 1 que teve restrição nos exames laboratoriais, 1 que passou a apresentar constipação intestinal crônica e 1 que iniciou um regime terapêutico com possível implicação no equilíbrio na microbiota. De modo que restaram apenas 3

indivíduos elegíveis e que forneceram amostras fecais para análise de microbioma, que também foram utilizadas para a avaliação de protocolos de produção de cápsulas de administração oral. Foram coletadas 3 amostras, de cada um destes indivíduos, em dias diferentes, que serviram para a comparar a diferença na riqueza e abundância de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) do microbioma deles, bem como do microbioma das fezes e das cápsulas correspondentes, durante a estocagem a -80°C, visando a definição de um protocolo para produção de cápsulas em série. A análise do microbioma das triplicatas de cada um dos três potenciais doadores não mostrou variação estatisticamente significativa na diversidade alfa entre eles, medida pelo índice de Shannon. Foram avaliados 4 protocolos de produção de cápsulas, 3 dos quais tinham como ingrediente básico, além das fezes, mistura de manteiga de cacau e glicerol, acrescidas ou não de salina 0,9% e que eram dispensados diretamente em invólucros de liberação tardia (DRcaps), de tamanho 00 ou em invólucros de gelatina, tamanho 0, que seriam transferidos posteriormente para os invólucros 00 DRcaps. Além de diferenças na composição de ingredientes, estes protocolos variavam quanto ao procedimento de remoção de resíduos das fezes e homogeneização da mistura. Todos os protocolos implicaram em perda na riqueza e abundância de OTUs, que chegaram a -98%, na comparação entre fezes e cápsulas correspondentes, um deles, adicionalmente, produziu um concentrado fecal sem fluidez insuficiente para a dispensação no invólucro, um deles apresentou baixo rendimento e um terceiro comprometia a estrutura dos invólucros. O protocolo que não apresentou estas limitações técnicas foi testado e aprovado quanto à capacidade de manter a abundância e riqueza de OTUs, durante estocagem das cápsulas por 124 dias, tendo sido o escolhido para a produção em série de cápsulas. Dois dos 3 potenciais doadores de fezes desistiram do processo de seleção, após a análise de seu microbioma fecal. De modo que um deles – na verdade uma potencial doadora – se submeteu aos exames finais para atestar a segurança de seu material fecal, tendo apresentado apenas restrições temporárias, posteriormente revertidas, passou a colaborar com o projeto. Seu microbioma fecal foi confrontado com o microbioma de mucosa de dois pacientes com retocolite ulcerativa, vindo a apresentar profundas diferenças no sentido de apresentar OTUs característicos de uma microbiota saudável, tais como Christensenellaceae, *Faecalibacterium* e Lachnospiraceae, sendo que estas duas últimas fizeram parte do *core microbiome* de suas fezes e das cápsulas correspondentes estocadas. A experiência de seleção de doadores, em que, ao final do processo, se conseguiu apenas 1 entre 221 (0,45%) candidatos, mostra uma taxa inferior aos estudos já realizados segundo os quais ~3% ao final são elegíveis.

ABSTRACT

Innumerable studies support the role of gut microbiota in maintaining the body homeostasis, so that oscillations in its species composition can be associated with the cause of many diseases. In some cases, these alterations, known as dysbiosis, can be reversed by the administration of probiotics, which comprise microorganism exerting some modulatory role, with beneficial effects extending to extra-intestinal parts of the body. A strategy for restoring the intestinal normobiosis comprise of the direct administration of stools from healthy subjects in the gut of those bearing some kind of dysbiosis associated disease. This approach, which has shown positive results in many clinical trials and has even been recommended for pathologies, such as *Clostridioides difficile* diarrhea refractory to antibiotic therapy, presents with many challenges, in view of the need of avoiding the cross-transfer of intestinal pathogens (safety) and the assurance of potential (efficacy). The aim of the present work was to investigate some issues relevant to assess the two points above, focusing in the formulation of an oral capsules for fecal transplantation (FT), considering a less invasive approach, by using a less invasive administration route. The first phase of the study comprised of the selection of candidates for stool donation, starting with a public call of national reach, followed by the selection process, which consisted of an interview, clinical and laboratory examinations to assure the healthy condition and absence of pathogens in the stools of potential candidates. Following or in parallel to this phase of evaluation for the safety level of the subjects' stools to qualify he or she for donation, the fecal microbiome was analyzed, to attest its efficacy. In addition to attest the safety condition of the candidate to be considered for donation, eliminating, for example, those diagnosed with chronic diseases, the interview enabled the gathering of information that could difficult or compromise routine stool collection and maintenance of the bacterial viability in the stools. The questions were divided in two categories: those with the aim of getting information of transient nature and those that could definitely compromise the eligibility of the subject. Of a total of 221 candidates, 196 were not qualified for reasons such as diagnosis of chronic diseases, living in places distant of the laboratory (out of Botucatu). The 25 candidates who passed the interview were requested to submit to preliminary laboratory examinations. Of these, 11 desisted the selection process and 6 declared to live out of Botucatu. The remaining 8 subjects comprised of one subject who was found to have restrictions in the laboratory examinations, one that displayed intestinal constipation and one which started a therapeutic regimen which could interfere with the species composition equilibrium of the gut microbiota. Therefore, only 3 subjects were eligible at the end of this phase and from whom 3 stool samples

were collected for microbiome analysis and also used for the evaluation of protocols for the production of capsules. Comparative analyses were performed in between the fecal microbiome and the corresponding capsules of the 3 subjects, by assessing the richness and abundance of their operational taxonomic units (OTU), after storage at -80°C. Microbiome analyses of the 3 samples from each of the candidates did not show statistically significant variations in the alpha diversity among them as determined by the Shannon index. A number of 4 protocols for capsule production were evaluated, 3 of which included cocoa butter and glycerol, in addition to stools, added or not with 0,9% saline in its formulation. The mixture was dispensed in DRcaps (00) or gelatin caps (0) involucres. In addition to the differences in the formulation, these protocols differed as to the procedure involved in the elimination of the stool residues and homogenization of the mixture. In all protocols an OTU loss was detected up to -90%, in the comparison between stools samples and the corresponding capsules. The formulation of one protocol was not fluid enough for dispensation in the involucres; that of second protocol produced a low yield, and of the third one induced crack in the involucres. The protocol which did not presented with any of the above technical limitations was tested and approved as to the ability of maintaining the richness and abundance of the OTUs in the capsules under storage in deep freezer, for 124 days, Two of the 3 candidates who still were considered for stool donation desisted of the selection process, after the analyses of their fecal microbiome. Therefore, a single donor remained, which then submitted to the final laboratory examinations for evaluation the safety of her stools. The examination results revealed only temporary restrictions, so that it came to be qualified for the for the donation. Her fecal microbiome was compared with those of the gut mucosa of two ulcerative colitis patients and profound difference was found, consisting in the presence of OTUs typical of a healthy organism in the donor (e.g. *Faecalibacterium*, Christensenellaceae and Lachnospiraceae). The proportion of selected donor among the candidates (1/221, 0.45%) matches those of similar studies conducted in the past, according to which less than ~3% of the candidates are eligible for stool donation.

Lista de Abreviaturas

16SV6rDNA- Região V6 do gene 16S do DNA ribossômico

AGCC- Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CC- Conteúdo para cápsulas

DII- Doença Inflamatória Intestinal

ESBL- *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*

FDA- *Food and Drug Administration*

ICD- Infecção por *Clostridioides difficile*

ITS- *Internal Transcribed Spacer*

IMC- Índice de Massa Corporal

OTU- *Operational Taxonomic Units*

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

RU- Retocolite Ulcerativa

TF- Transplantação Fecal

TGI- Trato Gastrointestinal

UNITE- *User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	MICROBIOTA INTESTINAL	15
1.2	TRANSPLANTAÇÃO FECAL	19
1.3	SELEÇÃO DE DOADORES PARA TRANSPLANTAÇÃO FECAL.....	22
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	A SELEÇÃO DE DOADORES DE FEZES	28
3.2	COLHEITA DO MATERIAL FECAL	29
3.3	PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS CÁPSULAS	31
3.4	ANÁLISE DO MICROBIOMA	33
3.4.1	PCR e sequenciamento dos amplicons	33
3.4.2	Processamento e análise das sequências.....	34
3.5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
4	RESULTADOS	37
4.1	EXPERIÊNCIA NA SELEÇÃO DE DOADORES DE FEZES	37
4.1.1	Divulgação do estudo e formulário com as questões de seleção	37
4.1.2	Dados da triagem inicial dos candidatos à doação	38
4.2	MICROBIOMA E PRODUÇÃO DAS CÁPSULAS	40
4.2.1	Definindo o protocolo de produção de cápsulas.....	40
4.2.2	Microbioma e condição de saúde do potencial doador D7.....	46
4.2.3	Produção em série de cápsulas	50
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÕES.....	60
7.	ANEXOS	62
I.	ANEXO 1.....	62
II.	ANEXO 2.....	65
III.	ANEXO 3	67

IV. ANEXO 4.....	69
V. ANEXO 5.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema do processo da seleção de doadores de fezes para transplantação fecal..	28
Figura 2: Suporte para recipiente coletor de fezes.	30
Figura 3: Medidas e volumes de acordo com o tamanho do invólucro.	32
Figura 4: Fluxograma mostrando as etapas de seleção de doadores de fezes e resultados de cada fase da triagem resultando em apenas uma pessoa disponível entre as elegíveis	39
Figura 5: Abundância média verificada nas cápsulas (C) e nas fezes (F) com as quais foram produzidas, estocadas por 3 (3F; 3C) ou 124 (124F, 124C) dias. *, <i>p</i> , entre 0,02 e 0,04. **, <i>p</i> =0,005.	44
Figura 6: Variação, em %, na abundância dos OTUs predominantes (que apresentavam ≥ 100 sequências de 16SV6rDNA) nas cápsulas, estocadas durante 3 ou 124 dias, em relação à abundância correspondente nas fezes com que foram produzidas, estocadas durante 3 dias.	45
Figura 7: Box plots representando a diversidade alfa, expressa pelo índice de Shannon, do microbioma fecal de potenciais doadores de fezes (D4, D5 e D7, em azul) e do microbioma de mucosa de portadores de RU (em vermelho).....	47
Figura 8: OTUs predominantes (biomarcadores) que distinguem o microbioma da mucosa intestinal de portadores de RU (duas amostras de biópsias de dois pacientes) e o microbioma fecal do potencial doador D7 (3 amostras de fezes colhidas em com intervalo de uma semana)	49
Figura 9: Variação na prevalência de OTUs pertencentes ao <i>core microbiome</i> das fezes (A) e das cápsulas (B) entre aqueles predominantes em onze amostras de fezes coletadas em dias distintos e oito de cápsulas	52

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sequências de primers utilizados para amplificação 16SV6rDNA e ITS2 para sequenciamento.....	35
--	----



INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Microbiota intestinal

O intestino humano contém um conjunto diverso e complexo de microrganismos, denominado de microbiota intestinal, e evoluiu com a espécie humana para o estabelecimento de uma relação mutuamente benéfica ^[1]. A microbiota intestinal se localiza principalmente na região do cólon sendo dominada por bactérias, porém é composta por outros microrganismos como fungos, vírus, arqueias e protistas ^[2].

A microbiota intestinal é importante para a manutenção da nossa saúde e desempenha várias funções, como fermentação de alimentos, proteção contra patógenos, estimulação da resposta imune e produção de vitaminas ^[3, 4]. Os filos bacterianos intestinais dominantes são Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Tenericutes, Fusobacteria e Verrucomicrobia, sendo os filos Firmicutes e Bacteroidetes representantes de cerca de 90% da microbiota intestinal ^[5]. No filo Firmicutes, encontramos a família Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, as mais abundantes em ambientes intestinais, representando cerca de 50% e 30% da microbiota, respectivamente ^[6]. Na família Lachnospiraceae, encontramos a predominância de bactérias do gênero *Blautia* spp., negativamente associada com disfunções fisiológicas do hospedeiro, como obesidade, diabetes, câncer e diversas doenças inflamatórias ^[7]. A *Roseburia* spp., pertencente também a família Lachnospiraceae, possui um papel importante no metabolismo energético, na manutenção da integridade da barreira intestinal e efeitos anti-inflamatórios mediados pela produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), como o butirato ^[8]. O butirato é a principal fonte de energia dos colonócitos e possui ações imunomoduladoras ^[9]. Tem sido sugerido que a produção de butirato pelos microrganismos intestinais confere benefícios à saúde ^[10]. Outra bactéria importante produtora de butirato é a *Faecalibacterium prausnitzii* da família Ruminococcaceae, uma das espécies bacterianas mais abundantes que habitam o intestino humano ^[11]. A *F. prausnitzii* atua no sistema imunológico e também está envolvida na manutenção da barreira intestinal ^[12, 13]. Além disso, possui a capacidade de inibir competitivamente bactérias patogênicas e aumentar a colonização de bactérias benéficas na microbiota intestinal ^[14]. Ainda no filo Firmicutes, temos a família Christensenellaceae considerada importante na manutenção da saúde metabólica e redução da inflamação ^[15].

No filo Bacteroidetes, os gêneros predominantes do trato gastrointestinal (TGI) humano são *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*, seguidos dos gêneros *Alistipes* e *Parabacteroides* ^[16]. As bactérias do filo Bacteroidetes desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade de um ecossistema intestinal saudável através da interação com o sistema imunológico, limitação da colonização do TGI por bactérias potencialmente patogênicas, produção de butirato, fermentação no cólon e metabolismo dos ácidos biliares ^[17-19]. As bactérias do gênero *Bacteroides*, juntamente com a *Bifidobacterium* spp., do filo Actinobacteria, são os principais produtores de AGCC, acetato e propionato, importantes fontes de energia para as células epiteliais intestinais e com funções imunomoduladoras ^[20].

Por muito tempo, a identificação de microrganismos foi limitada pela dependência de métodos que necessitavam de cultura, culminando em um escasso número de artigos relacionados ao tema, uma vez que apenas 10% a 25% dos microrganismos intestinais são cultiváveis ^[21]. Com o avanço tecnológico, surgiram os primeiros métodos de identificação baseados no DNA, como o método de sequenciamento de Sanger em 1970, mas com elevado custo associado a um prolongado tempo requerido para análise ^[22]. Somente a partir de 2005, com o surgimento da tecnologia de sequenciamento de alto rendimento, foi possível analisar sequências completas em um curto período de tempo ^[23]. Para caracterizar a composição taxonômica de um microbioma, o método mais utilizado é a amplificação e o sequenciamento de genes marcadores, como o 16S rDNA ^[24]. Este gene é muito utilizado uma vez que o RNA funcional codificado é essencial na síntese de proteínas e é altamente conservado em todas as bactérias, apresenta regiões variáveis e hipervariáveis que possibilitam a identificação taxonômica das bactérias ^[25]. A identificação de certos gêneros ou espécies representados em uma amostra e a abundância relativa de sequências amplificadas pode indicar aqueles que desempenham um papel importante na dinâmica do microbioma ^[26].

Além das bactérias, fungos são detectados no intestino de vários mamíferos, incluindo humanos, e formam a micobiota intestinal ^[27]. A micobiota intestinal humana possui uma baixa diversidade, em comparação com as comunidades bacterianas, sendo dominada pelos gêneros de leveduras *Saccharomyces*, *Malassezia* e *Candida*, sendo o gênero *Saccharomyces* o mais abundante nas fezes humanas saudáveis ^[28]. Apesar de compreenderem aproximadamente 0,1% do total de microrganismos do intestino, esta pequena comunidade fúngica desempenha um papel na saúde humana ao manter a homeostase intestinal e a imunidade sistêmica ^[29]. O sequenciamento das regiões do Espaçador Transcrito Interno (*Internal Transcribed Spacer-ITS*) é o padrão para análise de diversidade de fungos ^[30]. Além disso, sequências de ITS de

diferentes espécies estão disponíveis em bancos de dados online, incluindo UNITE (*User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza*) e o *International Nucleotide Sequence Database*, com uma ampla coleção de referências para classificação taxonômica [31, 32].

A diversidade taxonômica pode ser quantificada por medidas de diversidade alfa e beta. A diversidade alfa corresponde ao número médio de espécies encontrado numa determinada amostra, enquanto a diversidade beta quantifica as diferenças entre as amostras [33]. Perfis taxonômicos podem ser comparados usando métricas de similaridade, por exemplo, similaridade de Bray-Curtis, ou métricas de distância, como por exemplo, distâncias UniFrac [34]. Para comparar a abundância relativa dos diferentes taxa entre os grupos pode ser aplicada a análise de discriminação linear (LEfSe) que identifica os OTUs (*Operational Taxonomic Units*) com maior probabilidade de explicar diferenças (biomarcadores) entre duas amostras, com base em testes estatísticos-padrão, combinados a testes que indicam consistência biológica e relevância de efeito [35].

A homeostase da microbiota intestinal é extremamente benéfica para o hospedeiro, porém, se houver uma alteração na composição microbiana que cause um desequilíbrio importante entre os microrganismos benéficos e os potencialmente patogênicos, o intestino pode torna-se suscetível à algumas doenças [36]. Esse desequilíbrio na composição da microbiota é denominado de disbiose e, em geral, pode ser classificado em três tipos diferentes: 1) redução de microrganismos benéficos, 2) crescimento excessivo de microrganismos patobiontes/patogênicos, e 3) perda da diversidade microbiana geral [36]. Esses três tipos de disbiose não são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente [36]. A disbiose intestinal tem sido implicada em muitas doenças, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (DII), como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa (RU), obesidade, alergia, diabetes mellitus tipo 1, autismo, obesidade e câncer colorretal em modelos humanos e animais [37]. Tendo em vista que as DII foram um dos primeiros exemplos em que se demonstrou a associação de disbiose com a sua manifestação e complicação de sintomas, e que também será um modelo explorado nesse trabalho, a seguir será explorado um pouco mais da disbiose na RU.

A RU é caracterizada por uma inflamação crônica na mucosa colônica [38]. A extensão e gravidade da inflamação são variáveis e podem se estender da região do reto até o cólon ascendente [39]. Os sintomas clássicos são diarreias com presença de sangue ou muco, ou ambos, cólicas abdominais, urgência para defecar, bem como febre e perda de peso em casos graves [40]. A patogênese exata da RU ainda é desconhecida, mas vários fatores têm sido implicados,

incluindo uma resposta imune desregulada, suscetibilidade genética, fatores ambientais e alteração da microbiota intestinal ^[41].

A disbiose da microbiota intestinal na RU pode desencadear uma inflamação local, aumento da permeabilidade da mucosa e danos teciduais ^[42]. Em um estudo, foram demonstradas mudanças qualitativas e quantitativas na composição de bactérias entéricas em pacientes com RU ^[43]. A diversidade da microbiota intestinal em pacientes com RU é reduzida em aproximadamente 25% em comparação com indivíduos saudáveis, com reduções no filo Firmicutes, aumento de Bacteroidetes e anaeróbios facultativos ^[12]. Pode ser verificada também uma diminuição da abundância de algumas bactérias intestinais, como *Roseburia hominis*, *F. prausnitzii* e *Arkemansia muciniphila* ^[10, 44]. Embora a diminuição da diversidade microbiana possa estar ligada à RU ativa, a contribuição individual de uma única espécie bacteriana é menos bem definida ^[45]. No entanto, alguns patógenos estão possivelmente relacionados à inflamação intestinal, tais como *Escherichia coli* aderente-invasiva, *Clostridioides difficile*, *Helicobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Fusobacterium* spp., norovírus e *Listeria* spp. ^[42]. Em relação à microbiota, no entanto, alguns estudos em modelos animais e em pacientes com RU, observaram um aumento da carga fúngica e a translocação fúngica na mucosa durante a fase crônica e aguda ^[46-48]. Em um estudo randomizado, demonstrou-se que altos níveis de *Candida albicans* em pacientes com RU antes do tratamento foi associada ao aumento da diversidade bacteriana e a um melhor resultado da terapia ^[49].

O tratamento da RU compreende a administração de aminossalicilatos por via oral e retal, medicamentos imunossupressores e terapia biológica, focados na supressão da inflamação intestinal ^[50]. No entanto, essas terapias possuem baixa eficácia, um alto custo e não apresentam uma solução a longo prazo, além de aumentarem o risco de complicações como infecções, tumores e resistência ao tratamento ^[51]. O fato da RU possuir uma etiologia multifatorial e estar relacionada a uma disbiose intestinal, outras formas de tratamento como a manipulação da microbiota intestinal através da técnica de transplantação fecal (TF) pode ser considerada como uma opção terapêutica ^[52].

1.2 Transplantação fecal

A técnica de TF consiste na administração do material fecal de um doador saudável no TGI de um paciente visando alterar a composição da microbiota intestinal do receptor e conferir um benefício à saúde [53, 54].

Os primeiros registros da TF remontam ao século IV na China, onde a suspensão fecal humana era chamada de “sopa amarela” e era usada em pacientes com diarreia grave ou intoxicação alimentar [55]. O primeiro relato do uso da TF na literatura médica ocidental data de 1958 quando Eiseman et al. trataram pacientes com colite pseudomembranosa por enemas fecais [56]. Em 2013, Els et al. realizaram o primeiro ensaio clínico randomizado e observaram que a infusão de fezes de doadores em pacientes com infecção por *C. difficile* (ICD) recorrente teve eficácia mais significativa na resolução dos sintomas do que no uso de antibióticos isoladamente [57]. Em relação às doenças crônicas, o registro mais antigo da TF aplicada em uma doença não infecciosa foi publicado em 1989 quando Borody et al. realizaram enemas fecais em um indivíduo com RU refratária, que apresentou recuperação clínica completa e duradoura após o tratamento [58].

A experiência clínica atual com TF tem origem no tratamento de ICD recorrente ou refratária [59]. Vários estudos demonstraram altas taxas de eficácia da TF nesta infecção, e podem ser atribuídas à restauração da microbiota saudável após a terapia [60, 61]. A taxa de cura nas ICD recorrentes ou refratárias após a TF é de até aproximadamente 90%, o que é muito superior ao tratamento padrão com taxas de sucesso de 20-30% [57, 62]. Atualmente, há diretrizes de prática de TF no tratamento de ICD recorrente e refratária, e é a única indicação aprovada até o momento pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos desde 2013 [63, 64]. Além da ICD, há interesse no uso da TF como uma terapia potencial para uma série de doenças intestinais como RU, que será o modelo onde possivelmente as cápsulas deste trabalho serão utilizadas em um estudo clínico. [65-69].

O restabelecimento da diversidade de uma microbiota saudável depende principalmente da riqueza da microbiota do doador das fezes [70]. Rossen et al, em um ensaio clínico randomizado, demonstrou que a microbiota dos pacientes com RU no início do estudo apresentava uma baixa prevalência de *Clostridium* dos grupos IV, XIVa e XVIII e uma alta prevalência de *Bacteroides*, bactérias do filo Proteobacteria e *Clostridium* do grupo XI [71]. As bactérias do gênero *Clostridium* do grupo XIVa compreendem às espécies pertencentes aos

gêneros *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Dorea* e *Butyrivibrio* ^[72]. Logo após a TF, a composição da microbiota se tornou semelhante à dos doadores saudáveis nos pacientes respondedores à terapia ^[71]. Em outro caso de série, foi relatada a colonização de bactérias derivadas de doadores em pacientes que responderam a TF, incluindo *F. prausnitzii*, *Roseburia faecis* e *Bacteroides ovatus*, reconhecidas pela produção de AGCC ^[73]. No estudo de Moayyed et al., a análise da microbiota mostrou que a maioria dos pacientes que alcançou remissão clínica recebeu fezes de um único doador com uma grande abundância nas fezes da família Lachnospiraceae e do gênero *Ruminococcus* ^[74]. Paramsothy et al. relataram várias taxa microbiológicas, como *Barnesiella* spp., *Parabacteroides* spp., *Clostridium* do grupo IV e *Ruminococcus* spp., correlacionados com uma remissão clínica, enquanto *Fusobacterium* spp. e *Sutterella* spp. foram correlacionadas com uma persistência dos sintomas ^[75]. Já a análise de microbiota no estudo de Costello et al., demonstraram um aumento da abundância de espécies de *Anaerofilum pentosovorans* e *Bacteroides coprophilus* que foram fortemente associadas à melhora da doença após a TF ^[76].

Em relação à via de administração do material fecal, os estudos são muito heterogêneos. A TF pode ser realizada diretamente no TGI inferior através de colonoscopia ou enemas de retenção, ou pelo TGI superior através de sonda nasoentérica, endoscopia ou ingestão de cápsulas ^[77]. Em geral, a TF pela via GI superior é realizada em pacientes com inflamação colônica, no entanto, o desconforto durante o procedimento, riscos de aspiração, a incapacidade de avaliar a mucosa do cólon e o alto custo são alguns dos aspectos negativos desta via ^[78]. Por sua vez, a colonoscopia permite que o material fecal alcance o cólon por um todo, porém necessita de internação e anestesia ^[79]. A TF via enema de retenção é a mais acessível e menos invasiva do que a colonoscopia, mas o material fecal do doador fica limitado ao cólon distal ^[79]. Estudos mostraram melhores taxas de resposta com TF por colonoscopia em comparação com a via TGI superior ^[71, 74-76]. Nas administrações do TGI superior e inferior, a proporção das taxas de remissão clínica foi de 8% e 31%, respectivamente ^[80]. As taxas de resposta quando na administração via enema variaram de 24% a 32% nos ensaios clínicos randomizados ^[74-76]. Em um estudo com múltiplas aplicações de TF, a remissão clínica livre de esteroides foi alcançada em 46,3% dos pacientes ^[81].

A TF por cápsulas orais é a modalidade mais recente e pode ser uma opção para pacientes com contraindicações à colonoscopia, residentes em locais geograficamente distantes de onde realiza colonoscopia, resistentes ao acesso ao TGI inferior, ou que necessitam de administração contínua por um longo período ^[82, 83]. Dados sobre a utilização da TF via oral na RU são

escassos. No entanto, um estudo em que se demonstrou que pacientes com RU que receberam uma TF inicial por colonoscopia seguida de uma TF via oral observou-se taxas aumentadas de resposta clínica comparado com placebo ^[37]. Em outros três estudos, pacientes com RU encontraram efeitos benéficos da TF via cápsulas ^[84-86].

Em relação à formulação do material fecal, o tipo de invólucro e a forma de encapsulamento há uma grande variação entre os estudos ^[87]. A formulação oral normalmente é realizada em solução salina ^[88, 89]. Entre as preparações congeladas, a solução fecal é geralmente corrigida com 10-15% de glicerol ^[90]. O material fecal também pode ser homogeneizado com outros diluentes como associação de manteiga de cacau e glicerol, ou ser liofilizado com substâncias lioprotetoras ^[91, 92]. O tamanho e os tipos de invólucros também variam entre os diferentes estudos baseados na disponibilidade e no local pretendido de liberação do material fecal. A maioria dos estudos utilizam dois invólucros de tamanhos diferentes (invólucro tamanho 0 de gelatina dentro de invólucro tamanho 00 ácido - resistentes) ^[83]. Para que o invólucro mantenha sua integridade e a viabilidade bacteriana, o uso de invólucros ácido - resistentes é de grande importância para que não ocorra a liberação do material no estômago ^[93]. Em um estudo feito para testar a capacidade dos invólucros de resistir ao ambiente ácido presente no trânsito do TGI, descobriu-se que eram capazes de manter a estabilidade em um pH de 3 ou menor, a 37°C, antes de iniciar a liberação de seu conteúdo ^[94]. Dessa forma, invólucros ácido-resistentes permitem a liberação da solução fecal na região do cólon ^[95].

Em relação ao processamento das fezes, os métodos variam entre os ensaios clínicos de TF na RU. Paramsothy et al. e Costello et al. utilizaram fezes congeladas, enquanto Rossen et al. usaram fezes frescas ^[71, 75, 76]. Costello et al. processaram as fezes do doador anaerobicamente e os outros três estudos processaram as fezes aerobicamente ^[71, 74-76]. E em relação ao tipo de crioprotetor, Paramsothy et al. e Costello et al. utilizaram glicerol a 10%, e Moayyedi et al. utilizou somente água ^[74-76].

1.3 Seleção de doadores para transplantação fecal

A seleção de doadores é uma das etapas mais importantes do processo da TF a fim de minimizar o risco de transferência de doenças infecciosas, metabólicas e outras condições do doador de fezes para o receptor ^[96]. Em geral, todos os candidatos a doação devem passar por um questionário para uma avaliação de seu estado geral de saúde, exame médico e laboratoriais para avaliar a presença de potenciais patógenos, bem como análise da microbiota fecal ^[97].

O questionário de seleção deve ser formado por um conjunto de perguntas que permita conhecer dados pessoais do candidato tais como idade e residência, além do seu histórico e fatores de risco para doenças infecciosas e condições que possam estar associadas à alterações da microbiota ^[98]. O candidato deve ter preferencialmente menos de 50 anos, considerando que o aumento da idade tem sido associado à alteração da microbiota intestinal no sentido de um maior perfil oncogênico e inflamatório ^[87, 99, 100]. Outro dado pessoal relevante é o local de residência, dado a importância de limitar o tempo entre a colheita e a entrega das fezes para o processamento visando preservar o maior número possível de microrganismos anaeróbios ^[101].

As questões também permitem verificar o histórico ou fatores de risco para doenças infecciosas como infecções sexualmente transmissíveis, comportamento sexual de risco, vacinas com vírus atenuado e infecções do TGI ^[87]. Os candidatos que possuem algum tipo de doença crônica, tais como doenças atópicas, autoimunes, metabólicas, DII, neurodegenerativa ou psiquiátrica também são excluídos uma vez que, ao longo da última década, acumularam-se evidências consideráveis de estudos em animais e humanos mostrando uma ligação entre a microbiota intestinal e as doenças crônicas ^[102]. A composição da microbiota intestinal tem impacto no metabolismo de nutrientes e no gasto de energia, sugerindo que a TF possivelmente pode predispor a doenças como a obesidade ^[103]. Um parâmetro considerado na seleção dos candidatos é o Índice de Massa Corporal (IMC), um método utilizado para categorizar o peso (baixo peso, peso saudável, sobrepeso e obesidade) através da divisão do peso pelo quadrado da altura ^[104]. Este parâmetro passou a ser utilizado no processo de seleção após uma paciente com ICD ter se tornado obesa após receber TF de um doador com IMC de sobrepeso ^[105]. Alguns estudos identificaram diferenças na microbiota intestinal de indivíduos obesos e magros e observaram que a proporção de bactérias do filo Firmicutes para Bacteroidetes é significativamente maior em indivíduos com um IMC indicador de obesidade (acima de 29,9 Kg/m²) ^[106]. Além disso, há dados de correlação entre o aumento do filo Bacteroidetes nas fezes e perda de peso, e entre o desenvolvimento de obesidade e o filo Firmicutes ^[107, 108]. O

questionário também aborda o uso de alguns tipos de medicamentos, como os antibióticos, inibidores de bomba de prótons, imunossupressores e quimioterápicos por estarem associados a alterações negativas na microbiota intestinal ^[109].

Os testes laboratoriais para doenças potencialmente transmissíveis devem ser realizados nas fezes, sangue e região nasofaríngea nos candidatos que passaram pelo questionário ^[96]. O exame de sangue deve incluir hemograma completo, enzimas hepáticas, creatinina e proteína C reativa para verificar a condição clínica geral, sorologia para vírus da hepatite e vírus da imunodeficiência humana (HIV) ^[87]. O teste de fezes deve incluir patógenos entéricos comuns, toxinas para *C. difficile* e antígeno de *Helicobacter pylori* (este último exame apenas para TF via TGI superior) ^[98]. Os patógenos entéricos, que também devem ser investigados em indivíduos assintomáticos, devem ser detectados com métodos convencionais (cultura, microscopia ou teste de antígeno) e/ou com diagnóstico molecular (painéis baseados em reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* (PCR)) que demonstraram alta especificidade e sensibilidade em comparação com os convencionais. métodos na detecção rápida de patógenos ^[87]. As amostras fecais também devem ser testadas para bactérias resistentes a antibióticos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, *Enterococcus* resistentes à vancomicina, Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL)) e Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos, considerando a existência de indivíduos assintomáticos carreadores e o caso de morte de um paciente após a TF com material contaminado com *Escherichia coli* produtora de ESBL ^[110-112].

Atualmente, testes para detecção do Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) em amostras fecais e nasofaríngeas foram incluídos na triagem de doadores devido à pandemia da doença do coronavírus em 2019 (Covid-19) ^[113]. Embora seja uma doença tipicamente respiratória, os indivíduos infectados podem apresentar sintomas do TGI (diarreia e dor abdominal) uma vez que há o aumento da expressão nas células epiteliais intestinais da enzima conversora da angiotensina- 2 (ECA-2), permitindo a entrada do vírus na célula ^[98, 114]. Em resposta a esta situação, o FDA lançou um alerta de segurança sobre o risco de transmissão do SARS-CoV-2 por meio de TF e a necessidade de uma reorganização do fluxo de trabalho através de questionários e testes laboratoriais adicionais ^[98].

Finalmente, se todos os exames de sangue, fezes e de amostras nasofaríngeas forem negativos, o candidato é aceito para se tornar um doador de fezes. Em algumas situações, como

em bancos de fezes, o doador deve estar disponível para doar por várias vezes ao longo do tempo ^[98]. Por esse motivo, é aconselhável repetir os testes de triagem a cada 8–12 semanas e administrar um breve questionário no mesmo dia da doação para verificar se houve eventos prejudiciais de início recente ^[115]. Um banco de fezes é uma instalação que centraliza todos os serviços de seleção de doadores, processamento das fezes, armazenamento das preparações para TF, atendimento das solicitações de médicos, monitoramento dos pacientes, e segurança e eficácia do material ^[116].

O processo de seleção de doadores leva algumas semanas para ser concluído e possui uma taxa de aprovação de doadores de 4% a 10% ^[117-119]. Esse processo é logisticamente desafiador e causa uma demora no acesso do paciente ao tratamento ^[120]. A OpenBiome (Boston, MA, EUA), um dos maiores bancos de fezes do mundo, demonstrou que a taxa de aprovação de doação de fezes é de apenas 3% ^[121]. Desta forma, a seleção de doadores saudáveis que atendem a todos os critérios para TF é difícil e muitas vezes resulta na exclusão de um alto percentual de potenciais doadores ^[100]. Uma seleção cuidadosa dos doadores de fezes, abrangendo a composição da microbiota fecal, pesquisa por agentes infecciosos e 'fenótipos' indesejáveis, deve ser realizada preventivamente para a realização da TF ^[122].



OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Selecionar doadores de fezes e testar protocolos de produção de cápsulas para TF.

2.2 Objetivos específicos

- Definir questões relevantes na triagem inicial (entrevista) para seleção de doadores de fezes;
- Aferir protocolos de processamento de fezes para produção de cápsulas que impliquem em menor perda da abundância microbiana;
- Identificar candidatos à doação de fezes que, ao mesmo tempo apresentem potencial de restauração do equilíbrio da microbiota intestinal e sejam livres de qualquer agente causador de doenças.



MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e Métodos

3.1 A seleção de doadores de fezes

O processo de seleção de doadores consistiu nas seguintes etapas: aplicação de um questionário, análise da microbiota, exame médico 1, exames laboratoriais (1ª etapa), colheita das fezes, produção e armazenamento das cápsulas, exames laboratoriais (2ª etapa) e liberação das cápsulas para o uso pelos pacientes (figura 1).

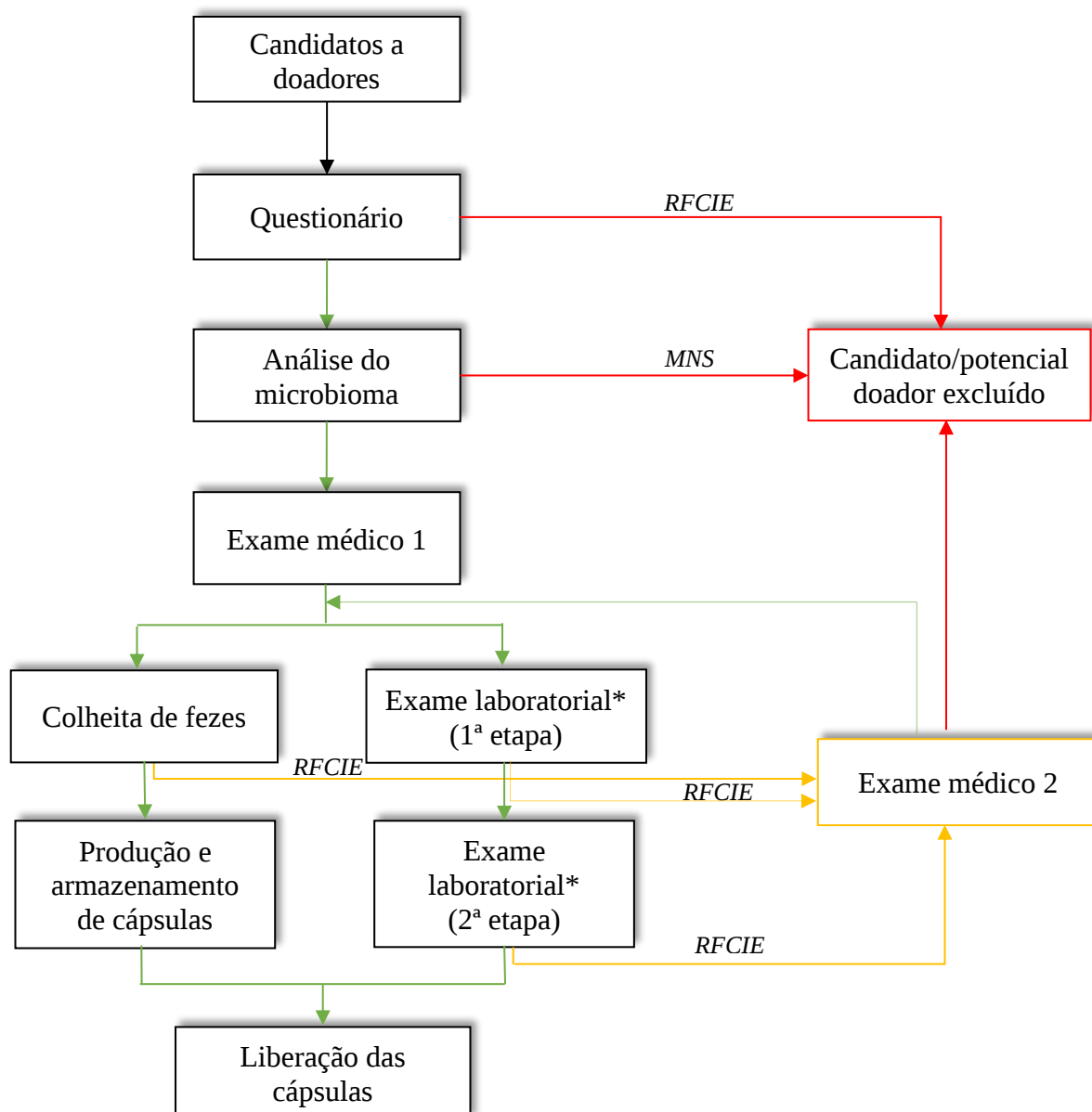


Figura 1: Esquema do processo da seleção de doadores de fezes para TF. Seta verde: resultados satisfatórios; seta vermelha: resultados insatisfatórios; seta amarela: com restrição. RFCIE: resposta fora dos critérios de inclusão e/ou dentro dos critérios de exclusão. MNS: microbiota não selecionada. * Ver ANEXO 2.

As perguntas do questionário foram organizadas em um formulário Google utilizado na divulgação do trabalho visando o alcance de interessados em participar do processo de seleção e teve como base o questionário do Consenso Internacional de Bancos de Fezes para Transplantação da Microbiota Fecal na Prática ^[87] e no banco de fezes OpenBiome ^[115]. O questionário teve como objetivo obter informações para verificar se os interessados em participar do processo de seleção se adequavam aos critérios de inclusão e exclusão agrupados em oito categorias conforme mostrado no ANEXO 1. A procura de possíveis interessados foi realizada por textos de divulgação contendo o link do formulário Google.

Os potenciais doadores selecionados na etapa do questionário forneceram fezes para análise do microbioma fecal para verificar a saúde da microbiota, tendo por base a diversidade alfa, ausência de grupos bacterianos potencialmente associados à causa de doenças, ocorrência de disbiose e a presença de grupos bacterianos indicativos de uma microbiota saudável.

Os potenciais doadores cujo microbioma melhor se encaixasse nos critérios acima foram submetidos à avaliação médica (exame médico 1). Indivíduos que passaram na triagem do questionário, análise do microbioma e exame médico, foram submetidos à 1ª etapa dos exames laboratoriais (ANEXO 2). Os demais foram eventualmente excluídos do processo de seleção dependendo das respostas ao questionário e dos resultados dos exames.

3.2 Colheita do material fecal

No momento da colheita do material fecal, o(s) potencial(ais) doador(es) aprovado(s) no processo de seleção tiveram que se comprometer a declarar que não tiveram nenhuma das seguintes condições: novos sintomas gastrointestinais (diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, icterícia), novos sintomas de infecção (febre, linfonodos inchados), uso de medicamentos (antibióticos, corticoides, quimioterápicos, inibidores da bomba de prótons ou similares), relações sexuais com novos parceiros, viagens para locais onde há surto de alguma doença, contato com sangue humano ou que estivessem no período menstrual.

O material fecal foi coletado pelo doador com auxílio de um dispositivo confeccionado com uma placa de policloreto de vinila (PVC) e moldado para encaixar no vaso sanitário. Ao centro, possui um encaixe para acoplar uma vasilha forrada com um saco de polietileno

transparente (37x25 cm) para diminuir os riscos de contaminação cruzada e facilitar a colheita de fezes (figura 2).



Figura 2: Suporte para recipiente coletor de fezes. Usado acoplado ao vaso sanitário. Todo o conjunto foi previamente higienizado com desinfetante Lysoform. Recipiente mostrado sem a tampa, removida somente durante a colheita, sendo o recipiente imediatamente tampado ao final da mesma.

Com o dispositivo, o doador recebeu instruções para a realização da colheita com informações sobre a higiene das mãos e do vaso sanitário, e armazenamento (ANEXO). Foi também instruído a fechar a vasilha e armazenar em bolsa térmica com gelo reciclável, levado ao laboratório até em quatro horas após a colheita.

3.3 Produção e armazenamento das cápsulas

Todo o processo de manipulação das fezes descrito abaixo foi realizado em condições assépticas, com material e soluções esterilizados, tendo-se o cuidado do uso de equipamentos de proteção individual e higiene pelos manipuladores.

Até chegar na formulação final da produção das cápsulas para administração oral, as quais foram estocadas a -80°C, foram realizados 3 testes- pilotos para se determinar os parâmetros técnicos que facilitassem o processamento, acondicionamento de maior carga microbiana possível no interior das cápsulas e garantir a sua viabilidade, bem como a integridade das cápsulas, antes e após a estocagem.

No primeiro teste-piloto, definido como Y, as fezes foram inicialmente pesadas e homogeneizadas com solução salina 0,9% em uma proporção 1:4 (p/v). A solução foi homogeneizada em um Erlenmeyer com pequenas esferas de vidro para auxiliar na homogeneização e, em seguida, passada em uma peneira de aço estéril ($\varnothing$ 1,0 mm). A solução fecal peneirada foi colocada em um tubo em U e centrifugada a 4920 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado glicerol (30%).

Em um segundo teste, definido como protocolo X, as fezes foram inicialmente pesadas e homogeneizadas com solução salina 0,9% estéril em uma proporção 1:1 (p/v). A solução foi homogeneizada em um Erlenmeyer com pequenas esferas de vidro e, em seguida, passada em uma peneira de aço estéril ($\varnothing$ 1,0 mm). O filtrado foi homogeneizado em um diluente estéril de manteiga de cacau (Brazilcoa[®]) em sua forma líquida (80%) mais glicerol (Dinâmica[®]) (20%) na proporção 1:1 (v/v) que originou uma emulsão fecal que foi então inserida em invólucros DRcaps (Capsugel[®]) tamanho 00.

Em outro teste-piloto, definido como protocolo W, as fezes com manteiga de cacau e glicerol foram maceradas dentro de um saco plástico de polietileno, de fechamento hermético (0,5 x 14,9 x 16,5 cm), na proporção 1:1(p/v) sem a adição de salina. Em seguida, foram passadas na peneira de aço ($\varnothing$ 1,0 mm) e inseridas em invólucros DRcaps (Capsugel[®]) tamanho 00. O último protocolo, definido como Z, foi o escolhido e será detalhado abaixo.

Assim que as fezes do candidato a doação chegaram no laboratório, foram avaliadas macroscopicamente para possíveis alterações patológicas (presença de sangue, muco ou parasitas) e conforme Escala de Bristol para Consistência de fezes ^[123]. As fezes com alguma

destas alterações e que não foram classificadas como 3 ou 4 da escala foram descartadas e não foram consideradas.

O processamento das fezes iniciou-se com a peneiragem das fezes em uma malha de aço ($\varnothing$ 1,0 mm), sendo o material coletado em um béquer. Em seguida, o conteúdo do béquer foi pesado, sendo-lhe acrescentado, na proporção 1:1 (p/v), uma mistura de manteiga de cacau com glicerol (8:2). Esta mistura foi completamente homogeneizada e passada por uma segunda malha de aço ($\varnothing$ 0,5 mm) e distribuída em volumes de $\sim$ 500 μ l nos invólucros incolores de gelatina (CAP GEL[®]) tamanho 0, com o auxílio de uma seringa de vidro de 20 ml. As cápsulas foram acondicionadas em frascos invioláveis (R40S/TP LACRE GP PHARMA) que foram etiquetados com número de lote e armazenados em freezer -80°C até a obtenção dos resultados da 2ª etapa dos exames laboratoriais do doador. Caso não houvesse nenhuma restrição nos exames, as cápsulas de gelatina 0 contendo o preparado acima, seriam retiradas dos frascos, introduzidas em invólucros ácido-resistentes (DRcaps Capsugel[®]) tamanho 00, acondicionadas novamente nos frascos e estocadas no freezer -80°C . As medidas e volumes dos invólucros para a confecção das cápsulas podem ser visualizadas na figura 3 abaixo.

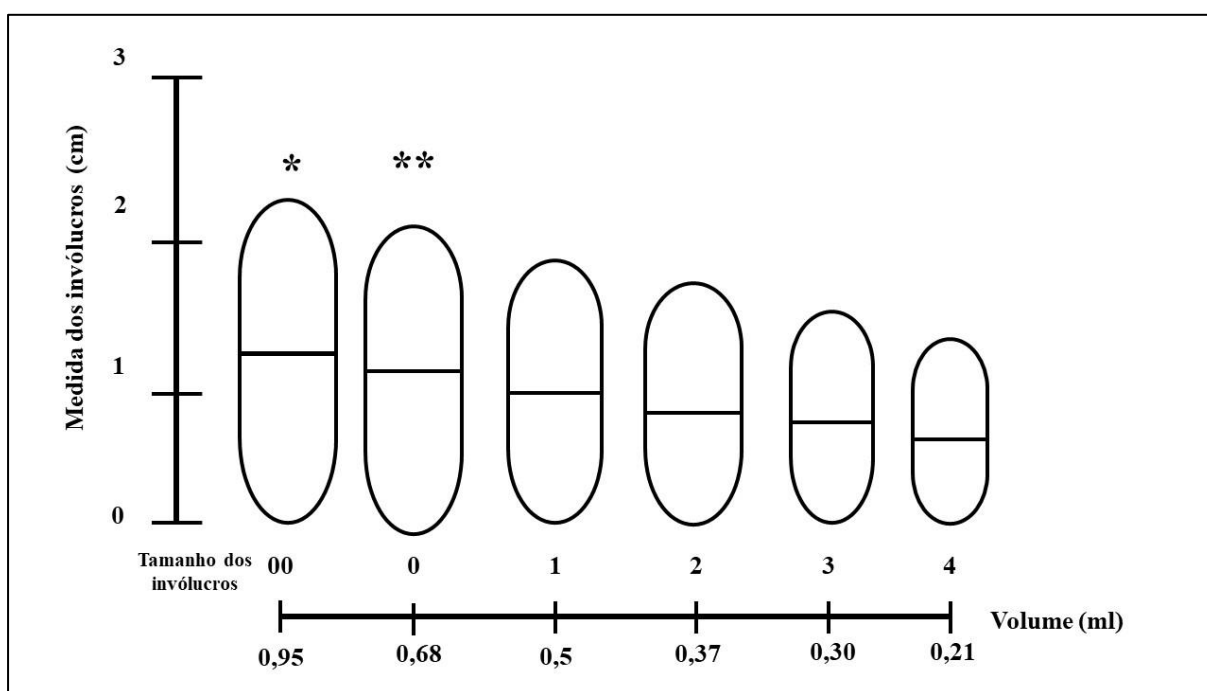


Figura 3: Medidas e volumes de acordo com o tamanho do invólucro. * Tamanho do invólucro ácido resistente (DRcaps). ** Tamanho do invólucro de gelatina (CAP GEL).

Para serem usados em ensaios clínicos sobre a eficácia da transplantação fecal, foram preparadas cápsulas-placebo de igual volume que consistiam em preparações contendo apenas

a mistura de manteiga de cacau com glicerol descrita acima, acrescida de um corante alimentício que mimetizasse a coloração das fezes.

3.4 Análise do Microbioma

3.4.1 PCR e sequenciamento dos amplicons

A extração de DNA das amostras fecais foi realizada, em sua maioria, com o *PureLink Microbiome DNA Purification Kit* (Invitrogen™), conforme as instruções do kit, sendo o DNA armazenado a -20° C.

A PCR para a amplificação do 16SV6rDNA foi realizada conforme o protocolo de Andersson e colaboradores [124], com modificação na temperatura de anelamento, e da região ITS2, de acordo com Taylor e colaboradores [125], com modificação na temperatura de anelamento e na ciclagem. Cada um dos *primers* foi desenhado com uma sequência adaptadora específica e, no caso do par *reverse*, houve a adição de uma sequência *barcode* de identificação da amostra alvo da amplificação. Os *primers* para amplificação do 16SV6rDNA foram 1061R_A_Bc e 784F_trP1, e os *primers* para amplificação do ITS2 foram 5.8S-Fun_A_Bc e ITS4-Fun_trP1, e estão descritos na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados para amplificação 16SV6rDNA e ITS2 para sequenciamento.

Sequências alvo	Identificação <i>Primers</i>	Sequências dos <i>primers</i>	Referência
16SV6 rDNA	1061R_A_Bc	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTC AG-NNNNNNNNNN*- GATCRRCACGAGCTGACGAC	[124]
	784F_trP1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGGAT TAGATACCCTGGTA	
ITS2	5.8S-Fun_A_Bc	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT- NNNNNNNNNNNN-AGTCAGTCAG-GG- AACTTTYRRCAAYGGATCWCT	[125]
	ITS4-Fun_trP1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTATGG TAATTAAAGCCTCCGCTTATTGATATGC TTAART	

**barcodes*

Ao final da PCR, foi realizada uma eletroforese dos amplicons em gel de agarose (Sigma[®]) a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA para visualizar se houve amplificação específica utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular. As sequências amplificadas foram purificadas através do sistema de *beads* magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter[®]) e quantificadas no aparelho Qubit 3.0 *Fluorometer* (Invitrogen[®]), com o kit de quantificação Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen[®]). Em seguida, uma biblioteca de amplicons de 26 pM foi formada contendo concentrações equimolares de cada um de um total que variava de 20 a 32 amplicons. Essa biblioteca foi então submetida a uma PCR em emulsão. Para isto, foi misturada aos *primers* e demais componentes da PCR juntamente com microesferas (*Ion Spheres Particles* – ISPs) e óleo. A mistura foi então colocada em um termociclador especializado (*Ion One Touch™*) onde a reação se processou.

Ao final desta PCR, o produto da amplificação foi submetido a um processo de eliminação de resíduos de reagentes e microesferas com falhas na amplificação, de modo que, ao final do processo, se obteve uma alta concentração de microesferas com DNA em condições de ser sequenciado (ISPs enriquecidas). O DNA nas ISPs enriquecidas foi então submetido ao anelamento do *primer* específico para sequenciamento, e misturado com *Taq Dna polymerase*, sendo a mistura carregada em um chip 314 v2-BC, que foi introduzido no sequenciador *Ion PGM*, previamente submetido à inicialização (condicionamento, com ajuste de pH e mistura de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) no ambiente de sequenciamento do aparelho). Durante o sequenciamento, o sequenciador esteve ligado a um servidor responsável pelo armazenamento das sequências, geradas na forma de arquivos *.fastq. A metodologia acima descrita está detalhada no manual do fabricante do kit de PCR em emulsão ^[126] e de sequenciamento ^[127].

3.4.2 Processamento e análise das sequências

A geração dos dados no servidor, conforme mencionado acima, era acompanhado do processamento das sequências, eliminando erros do tipo quimeras de DNA, *primers*, *barcodes* e adaptadores, sendo que ao final, o servidor apresentava um relatório com informações sobre a qualidade e ocorrência do sequenciamento, consistindo em QC20, fragmentação do DNA, tamanho e número de sequências, porcentagem de carregamento do chip e ISPs, etc. Para cada amostra era gerado um arquivo *.fastq.

Todo o processo de análise das sequências foi realizado na plataforma Qiita^[128] que foi dividido em duas etapas: 1) preparo, organização das sequências e construção da tabela de OTUs e 2) análise e correlações estatísticas com os dados desta tabela. Na primeira etapa, foi feita a separação das sequências de cada amostra e pesquisa na base de dados Silva119^[129] (no caso de 16S - para bactérias) e UNITE8^[130] (no caso de ITS2 – para fungos), em busca da identidade de cada OTU, com base nas sequências presentes. Os dados gerados na etapa 2 se basearam na relação de OTUs identificados e que foram agrupados em um arquivo *.csv. Depois de baixar e conferir suas informações, este arquivo foi utilizado para as seguintes análises estatísticas: cálculo do Índice de Shannon para determinação da diversidade alfa, teste T, LEfSe baseado nos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. A determinação do *core microbiome* (conjunto de microrganismos comuns em diferentes amostras) foi feito pela construção do diagrama de Venn com o auxílio de uma ferramenta hospedada no site^[131].

3.5 Considerações éticas

Para participar deste projeto, os doadores de fezes e os pacientes com RU manifestaram expressamente sua concordância, ciência dos procedimentos e disposição em colaborar com o mesmo, mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido recomendado pelo Comitê de ética em Pesquisa de Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu no momento dos exames clínicos. Toda a execução dos procedimentos aqui descritos foi aprovada pelo CEP/FMB (Número do Parecer: 3.009.218). O parecer do CEP pode ser visualizado no ANEXO 4.



RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Experiência na seleção de doadores de fezes

4.1.1 Divulgação do estudo e formulário com as questões de seleção

Inicialmente, nos preocupamos em fazer a divulgação do trabalho para conseguir possíveis interessados e, para isso, contamos com o auxílio da assessoria de imprensa da Unesp^[132]. Depois, como resultado da divulgação no site da Unesp, houve interesse da imprensa local, sendo este estudo posteriormente divulgado no portal de notícias G1 da região de Bauru-Marília^[133], o que gerou interesse de pessoas de fora da região de Botucatu em participar do estudo interesse este verificado pelo número de respostas no formulário Google.

O formulário foi aperfeiçoado durante o processo com alguns ajustes. Por exemplo, como resultado da ampla divulgação, devido ao interesse de pessoas de vários estados brasileiros de se tornarem doadoras de fezes, a primeira alteração do formulário foi no sentido de restringir o grupo de interessados a pessoas residentes (temporários ou permanentes) em Botucatu ou na região, pela questão logística de colheita das fezes. Assim, a pergunta sobre residência do candidato passou a ser de múltipla escolha, com as seguintes alternativas: reside em a) Botucatu, b) São Manuel, ou c) outra cidade, mas estuda em Botucatu, sendo que indivíduos que se encaixassem nesta última categoria deveriam informar sobre sua possível permanência em Botucatu durante o período de colheita de fezes.

Uma outra questão, que também impacta a logística de colheita e processamento das fezes diz respeito aos hábitos de evacuação do candidato (trânsito intestinal e horários de evacuação), de modo que questões foram acrescentadas ao formulário para obtermos essas informações.

O formulário também foi modificado no sentido de separar questões cujas respostas poderiam variar bastante em função do tempo daquelas que tinham como objetivo obter informações menos sujeitas a variações. Deste modo, o formulário inicial foi dividido em dois, sendo que o primeiro abordava questões gerais, tais como dados pessoais, IMC e condição geral de saúde, enquanto o segundo tratava de questões temporais, tais como, tipo de dieta, histórico de hospitalização, vacinação, realização de viagens e tempo de permanência em Botucatu (no caso de residentes temporários).

4.1.2 Dados da triagem inicial dos candidatos à doação

Entre maio de 2019 e março de 2022, um total de 221 candidatos a doação de fezes preencheram o questionário. Um total de 196 indivíduos não passou nessa etapa inicial do processo de seleção, a maioria das quais tendo sido reprovada por não preencherem os requisitos de residência. Este e outros motivos de exclusão são apresentados no esquema da figura 4 abaixo.

Dentre os 25 indivíduos restantes, apenas 8 realizaram o exame médico e se submeteram a pelo menos alguns dos seguintes exames laboratoriais (referidos como preliminares na figura 4), que consistiram em: coprocultura, exames de sangue (hemograma, glicemia, ureia/creatinina, bilirrubina, perfil hepático, perfil lipídico, HIV, hepatite A, B e C), e exames de fezes (parasitológico, toxina A/B de *C. difficile*, coprograma e calprotectina). Estes exames não foram previstos conforme apresentado na seção de Materiais e Métodos (figura 1). Mas de alguma maneira contribuíram com dados no sentido de identificar potenciais doadores ou definitivamente excluir potenciais candidatos como é o caso de um doador que exames de perfil lipídico alterados (aumento de lipoproteína de baixa densidade e muito baixa densidade, colesterol total e triglicérides) acompanhados de aumento do exame de alanina aminotransferase (ALT), um marcador de lesão hepática, indicando um quadro de esteatose. Outro candidato apresentou infecção por *Blastocystis hominis* e, após tratamento, foi reinserido no processo de seleção.

Deste modo, restaram 7 potenciais doadores elegíveis, tendo havido a exclusão de 2 por motivo de mudança de Botucatu (D2 e D3), 1 em razão de alteração na Escala de Bristol (D1) e outro por ter iniciado um regime terapêutico preventivo (D6). Os 2 restantes desistiram de continuar no processo de seleção (D4 e D5). Assim sendo, tivemos ao final, uma única pessoa elegível para a doação de fezes (figura 4) que se submeteu aos exames laboratoriais para atestar completamente a sua saúde e divididos em duas etapas conforme mencionado na figura 1. Este candidato, denominado de D7, com outros indivíduos acima mencionados, e denominados de D4 e D5, que submeteram ao processo de seleção, tiveram o microbioma de suas amostras de fezes comparativamente analisadas.

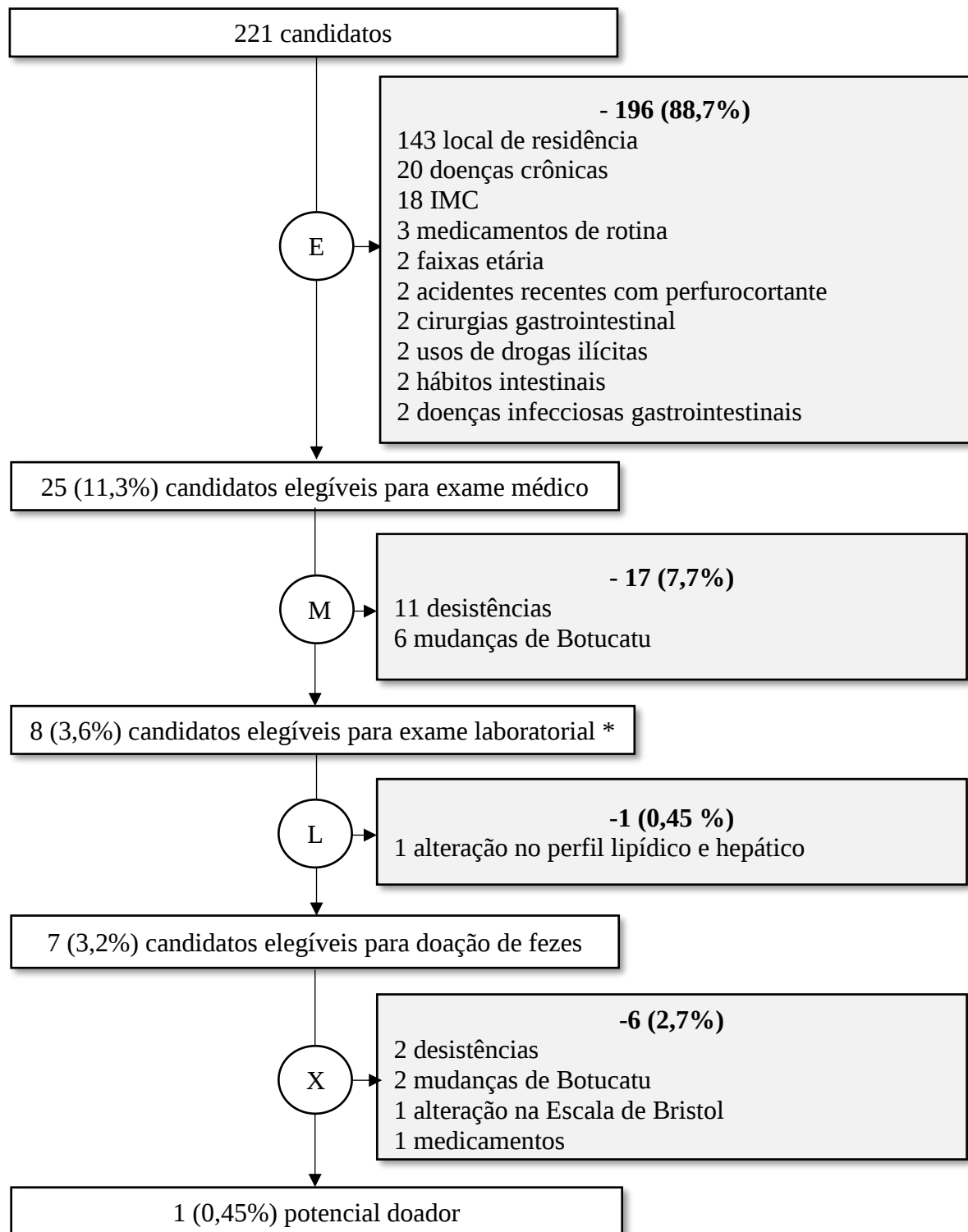


Figura 4: Fluxograma mostrando as etapas de seleção de doadores de fezes e resultados de cada fase da triagem resultando em apenas uma pessoa disponível entre as elegíveis. E: entrevista; M: exame médico; L: exame laboratorial preliminar; X: desistência e outros motivos. * Exames preliminares (ver texto).

4.2 Microbioma e produção das cápsulas

4.2.1 Definindo o protocolo de produção de cápsulas

A escolha do protocolo de produção de cápsulas considerou questões técnicas envolvidas na manipulação das fezes, bem como a possibilidade de redução na diversidade e abundância (número de sequências de 16SV6rDNA) de microrganismos durante a estocagem. As questões técnicas dizem respeito, por exemplo, a facilidade de homogeneização, eliminação de partículas, e geração de uma mistura (emulsão) suficientemente fluída e com consistência ideal para a introdução no invólucro capsular e fechamento das cápsulas (encapsulação). Em paralelo, foi também considerado o nível de perda microbiana, a fim de assegurar que a cápsula tenha algum grau de eficácia nos ensaios clínicos em que for utilizada. Quatro protocolos, designados W, X, Y, Z foram testados para avaliar estas questões, cujos resultados serão aqui apresentados, em especial com relação à possibilidade de implicar em perda microbiana. Para estes testes, foram utilizadas fezes dos candidatos D4, D5 e D7.

A avaliação de cada protocolo foi feita comparando-se o microbioma de cápsulas e das fezes correspondentes *in natura* com as quais elas foram produzidas, após um período definido de estocagem a -80°C.

O primeiro protocolo testado consiste na mistura das fezes na proporção 1:4 (p/v) com uma solução salina a 0,9% contendo 30% de glicerol e é aqui referido como protocolo Y. Este protocolo foi testado com uma amostra de fezes do candidato D4 e, como será mencionado a frente, não foi possível produzir cápsulas com os mesmos. Conteúdo para cápsulas (CC) foi produzido e estocado, durante 35 dias a -80°C, juntamente com amostra das fezes com as quais foram produzidos. O DNA, tanto de CC neste protocolo -e de cápsulas, de protocolos seguintes- como das fezes (F), foi submetido à análise de microbioma. O número de OTUs nas fezes e nos CC foi, respectivamente, de 74 e 64, após a estocagem no freezer. Na comparação do microbioma F-CC, houve menor abundância ou inexistência, no CC, da maioria (64/74, 86%) dos OTUs nas fezes. Considerando que a maior parte dos OTUs, tanto nas fezes quanto nos CC, tinha menos que 10 sequências, a fim de verificar a diferença no microbioma F-CC, entre OTUs mais representativos, comparou-se a variação F-CC entre OTUs com 100 ou mais sequências (>100). Houve diferença negativa (para menos) na abundância de todos os OTUs dos CC desta categoria (que incluiu 11 OTUs) em relação às fezes, que variou de -70 a -90%. Além de não favorecer a preservação da microbiota fecal, este protocolo resultou em um concentrado final pouco fluído, a ponto de não ser possível sua transferência para os invólucros e produção de

cápsulas com o mesmo. Por isto, para a estocagem no freezer, a massa resultante foi mantida no interior dos tubos onde foram produzidas.

Um segundo protocolo (protocolo X) consistiu em inicialmente misturar as fezes com salina na proporção 1:1 (p/v), homogeneizar com pérolas de vidro, por agitação, e peneirar em malha de 1,0 mm. À suspensão resultante, foi então acrescentada, na proporção 1:1 (v/v), mistura de manteiga de cacau com glicerol 8:2 (v/v) pré-aquecida a 37°C. A emulsão final foi então encapsulada em invólucros DRcaps tamanho 00. A avaliação deste protocolo foi feita com 3 amostras de fezes colhidas em momentos distintos do candidato D4. As fezes e cápsulas correspondentes de cada amostra foram estocadas a -80°C por períodos distintos (53, 81 e 127 dias). O número de OTUs nas fezes e cápsulas com um total de sequências ≥ 100 em 53 dias de crio-estocagem foi de 19. Deste total, observou-se variação negativa nas cápsulas em relação às fezes em 6 deles (6/19, 32%). Com 81 dias de estocagem, esta variação foi de 8/13 (62%) e com 127 dias foi de 15/16 (94%). A variação média F-C por OTU foi de -89%, -23% e -51%, em 53, 81 e 127 dias de estocagem. Não houve variação estatisticamente significativa (pelo teste T) no *core microbiome* (OTUs encontrados nas amostras de fezes e de cápsulas) dos três períodos analisados).

O protocolo X foi também testado em uma amostra de fezes e das cápsulas correspondentes de um voluntário não envolvido no processo de seleção de doadores. A análise do microbioma das fezes e das cápsulas foi feita 99 dias após a colheita das fezes e produção das cápsulas, que foram mantidas a -80°C neste período. Decorridos 353 dias de estocagem no freezer, o microbioma das cápsulas foi novamente analisado. Na análise da amostra de fezes e das duas de cápsulas (com 99 e 353 dias de estocagem), verificou-se um total de 15 OTUs predominantes (com ≥ 100 sequências). Houve uma variação negativa em 13 (87%) e 8 (53%) destes OTUs nas cápsulas estocadas por 99 e 353 dias, respectivamente, em relação ao microbioma das fezes. Porém, estas diferenças não se mostraram estatisticamente significativas (pelo teste T) em ambos os períodos de estocagem das fezes e cápsulas.

O protocolo X apresentou uma limitação que impossibilitou o seu uso: a emulsão final a ser envasada comprometia a estrutura dos invólucros, dificultando a colocação das tampas, afetando muitas fezes 100% da integridade dos mesmos. Verificou-se que este problema acontecia em função da salina presente na mistura, acrescentada para conferir uma tensão osmótica fisiológica e facilitar a homogeneização da mistura. Todavia, por conta de seu comprometimento da encapsulação, a salina foi eliminada na fórmula, mudança esta que com outras alterações definiram o protocolo W.

No protocolo W, as fezes foram misturadas diretamente na proporção 1:1 com solução de manteiga de cacau e glicerol (8:2, v/v), previamente aquecida, maceradas e homogeneizadas no interior de um saco plástico de polietileno. A suspensão produzida foi então peneirada e envasada em invólucros DRcaps 00. Este protocolo foi aplicado a amostras de fezes dos candidatos D4 e D5. Porém, fezes e cápsulas foram estocadas por apenas 4 e 5 dias (D5 e D4, respectivamente). Na comparação F-C de amostras de ambos os indivíduos, o número de OTU predominantes (≥ 100 sequências) em fezes e cápsulas foi de 9 e 11 para D4 e D5, respectivamente. Enquanto 2/3 dos OTUs apresentaram variação negativa (entre -1 e -25%) nas cápsulas, em relação às fezes para D4, apenas um OTU apresentou diferença negativa F-C, para D5. Todavia, as variações F-C tanto para D4 quanto para D5 não foram estatisticamente significativas no teste T. Neste protocolo, verificou-se baixo rendimento do componente final a ser aplicado na cápsula, tendo em vista a retenção da mistura no saco plástico.

O protocolo Z consistiu na peneiragem das fezes em uma malha de aço de 1,0 mm, adição, (na proporção 1:1, p/v) da mistura de manteiga de cacau com glicerol (8:2, v/v), pré-aquecida a 37°C, homogeneização em um béquer e passagem numa segunda malha de aço, desta vez de 300 μ m. A emulsão final foi utilizada para o envase de invólucros de gelatina 0, que foram estocadas a -80°C. Para avaliação da eficácia deste protocolo, segundo os critérios mencionados no primeiro parágrafo desta seção, aproximadamente 100 cápsulas foram produzidas com as fezes do candidato D7. As cápsulas, bem como duas amostras de fezes *in natura* foram estocadas a -80°C. Após 3 dias, foi feita a análise de microbioma de uma das amostras de fezes, bem como de algumas das 100 cápsulas estocadas. A segunda amostra de fezes e algumas amostras de cápsulas tiveram seu microbioma analisado após 124 dias. Os resultados desta análise são apresentados abaixo.

A amostra de fezes estocada por 3 dias apresentou um total de 206 OTUs, com uma média de 53,5 sequências de 16SV6rDNA/OTU. As cápsulas correspondentes estocadas durante 3 dias apresentaram 185 OTUs, com uma média de 13,9 sequências de 16SV6rDNA/OTU. A diferença para menos observada no número de OTUs e abundância relativa no microbioma das cápsulas foi estatisticamente significativa ($p=0,01$, teste T). Por outro lado, o número de OTUs das cápsulas estocadas por 3 dias (185) foi aproximadamente igual ao das cápsulas estocadas por 124 dias (178) (diferença não significativa). Observou-se também diferença estatisticamente não significativa no número médio de sequências de 16SV6rDNA/OTU, entre estes dois períodos de estocagem das cápsulas. Em relação às fezes, porém, as amostras estocadas pelo período mais longo (124 dias) apresentou pouco mais da

metade (126) do número de OTUs (206) encontrados nas amostras estocadas por 3 dias e a abundância média por OTU das primeiras foram cerca de 1/5 ($9,9 \times 53,5$) daquela observada nas amostras estocadas por 3 dias (valor de $p = 0,005$, para estas comparações, no teste T).

Os dados acima são do total de OTUs de cada amostra, cuja abundância/OTU difere bastante, indo de 1 a quase 3000 sequências de 16SV6rDNA. De modo que, para avaliar de modo mais preciso a variação do microbioma entre as amostras, considerou-se, nos dados abaixo, apenas os OTUs predominantes (com número de sequências ≥ 100), que representam cerca de 80% da abundância das 4 amostras analisadas. A figura 5 mostra que, neste grupo, formado por 21 OTUs, o número médio de sequências nas cápsulas estocadas por 3 ou 124 dias foi menor que nas fezes estocadas por 3 dias e que a abundância nas cápsulas estocadas por 124 dias foi maior do que nas fezes estocadas pelo mesmo período. Estas diferenças foram estatisticamente significativas. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa na abundância média das amostras de cápsulas. Estes dados obtidos pela análise dos OTUs dominantes confirmam os resultados do parágrafo acima, relativos ao total de OTU de cada amostra.

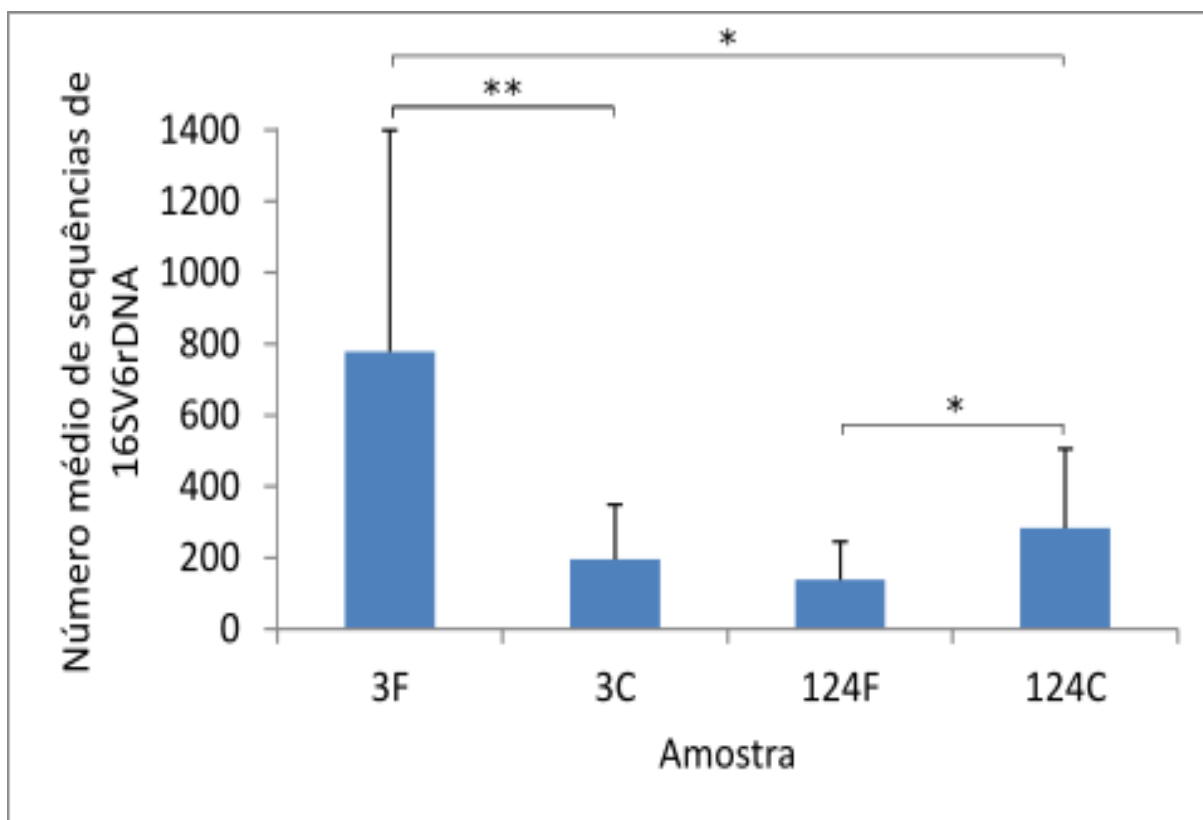


Figura 5: Abundância média verificada nas cápsulas (C) e nas fezes (F) com as quais foram produzidas, estocadas por 3 (3F; 3C) ou 124 (124F, 124C) dias. *, p , entre 0,02 e 0,04. **, $p=0,005$.

O gráfico da figura 6 apresenta a diferenças na abundância de cada um dos OTUs predominantes, na comparação entre cápsulas estocadas por 3 e 124 dias e as fezes com as quais foram produzidas e estocadas por 3 dias. Houve uma menor abundância em todos os OTUs das cápsulas estocadas por 3 ou 124 dias em relação às fezes com que foram produzidas e estocadas por 3 dias, diferença esta que chegou a até -99%. As menores diferenças F-C foram observadas nos OTUs que apresentaram maior abundância nas fezes (*Lachnospiraceae*, *Faecalibacterium* e *Blautia*).

Diferentemente dos demais, o protocolo Z não apresentou nenhuma limitação técnica e não implicou em redução da abundância no microbioma maior do que aquela observada nos protocolos testados anteriormente. Conforme já mencionado, este protocolo emprega invólucros de gelatina de tamanho 0, forma em que as cápsulas serão estocadas a -80°C até o uso. Para ser utilizadas na transplantação fecal, elas serão introduzidas em cápsulas DRcaps 00.

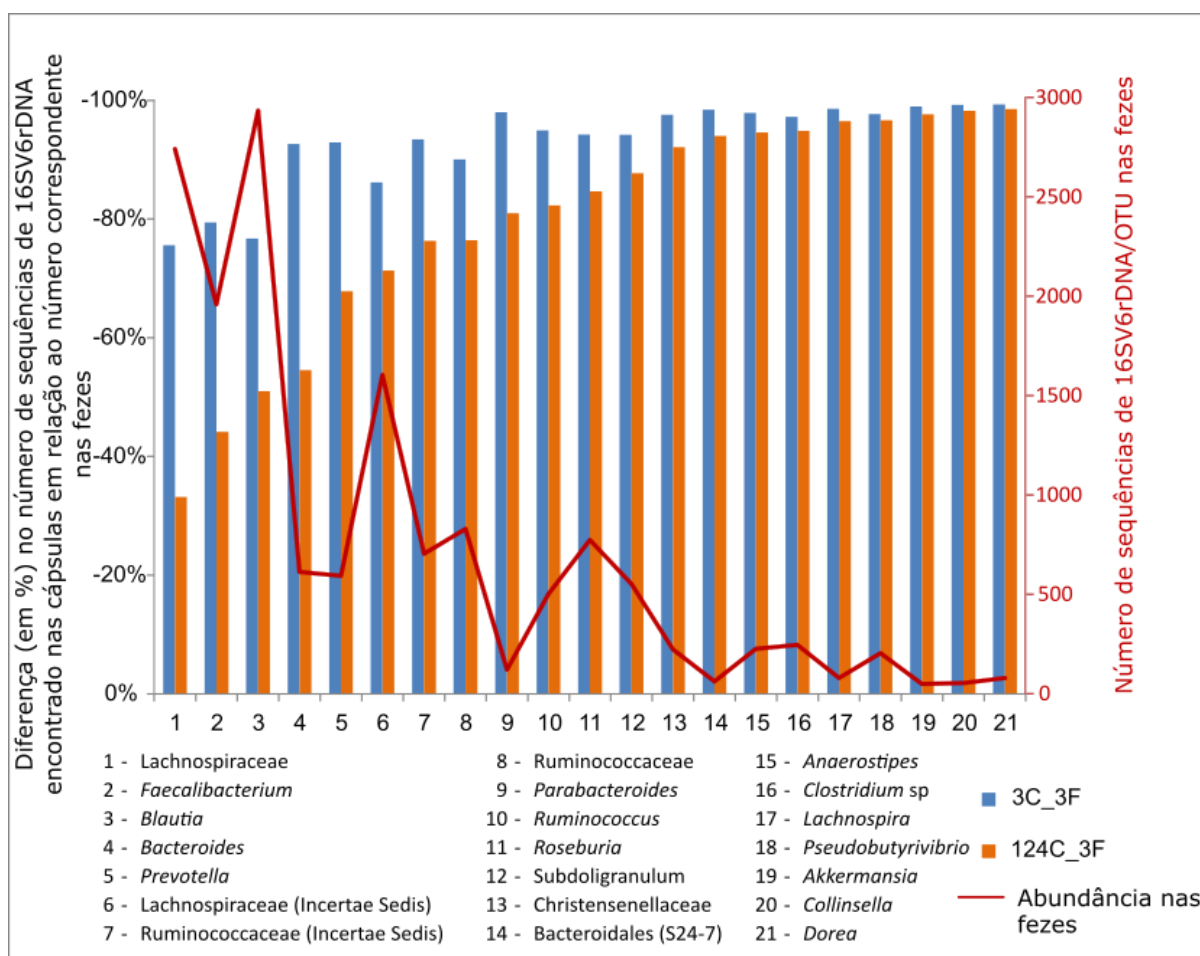


Figura 6: Variação, em %, na abundância dos OTUs predominantes (que apresentavam ≥ 100 sequências de 16SV6rDNA) nas cápsulas, estocadas durante 3 ou 124 dias, em relação à abundância correspondente nas fezes com que foram produzidas, estocadas durante 3 dias. 3C_3F, variação entre fezes e cápsulas com as quais foram produzidas estocadas por 3 dias. 124C_3F, variação entre cápsulas estocadas durante 124 dias e as fezes com as quais foram produzidas estocadas por 3 dias. A identidade de cada OTU é apresentada abaixo do gráfico.

4.2.2 Microbioma e condição de saúde do potencial doador D7

O candidato D7, até então elegível e que manteve o interesse em colaborar com o projeto, compreende um indivíduo do sexo feminino, com 35,5 anos, IMC de 23 kg/m², residente em Botucatu, do qual foram inicialmente colhidas 3 amostras de fezes, com uma semana de intervalo entre cada colheita. Estas amostras foram submetidas à análise comparativa de microbioma, com dados de 3 amostras de fezes de cada um dos dois potenciais doadores desistentes (D4 e D5), bem como com dados do microbioma de 2 amostras de biópsias intestinais de cada um de dois pacientes com RU ^[134], colhidas em momentos distintos (no total, 4 amostras).

O gráfico da figura 7 apresenta a diversidade alfa, expressa pelo índice de Shannon, de cada um dos grupos analisados. D7 apresentou a maior média de índice de Shannon, entre os 3 potenciais doadores, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa pelo teste T. Também, não houve variação estatisticamente significativa ($p=0,1$ teste T) na comparação do microbioma fecal de D7 com o microbioma de mucosa dos pacientes com RU.

A diversidade alfa representa a riqueza e quão equilibrada é a abundância (*evenness*) entre OTUs, sem indicar quais são estes OTUs, em uma dada amostra. Daí a importância de se associar ou complementar estas informações com outras análises. Por isto, em busca de evidências sobre o potencial da microbiota fecal de D7 em contribuir para restauração do equilíbrio da microbiota intestinal de portadores de RU, submeteu-se o seu perfil de OTUs a uma análise de discriminação linear (que revela a presença de biomarcadores) em relação ao perfil equivalente dos dois pacientes com RU. Conforme mostrado na figura 8, as bactérias que mais se destacam na microbiota de D7 compreendem OTUs que, conforme dados da literatura, contribuem para a homeostase intestinal, tais como Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Christensenellaceae. Por outro lado, entre os pacientes com RU, biomarcadores de destaque são bactérias gram-negativas (particularmente enterobactérias) e *Staphylococcus*, conhecidos por incluírem espécies potencialmente patogênicas.

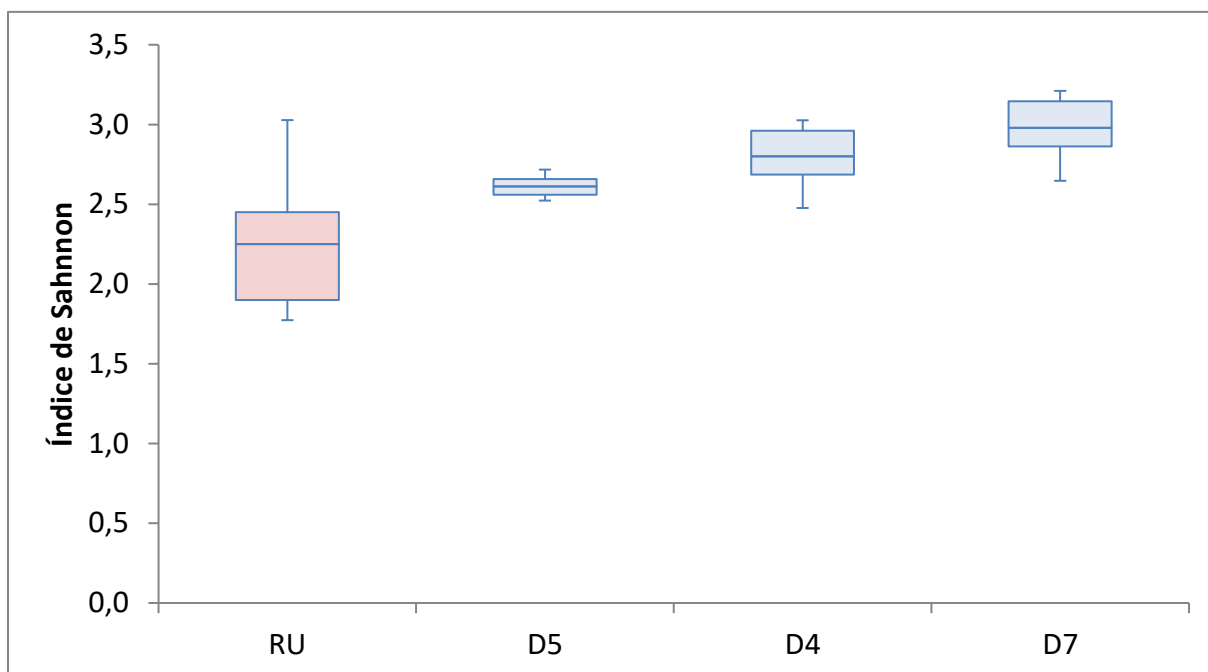


Figura 7: *Box plots* representando a diversidade alfa, expressa pelo índice de Shannon, do microbioma fecal de potenciais doadores de fezes (D4, D5 e D7, em azul) e do microbioma de mucosa de portadores de RU (em vermelho). Os valores são de três amostras de fezes colhidas em dias diferentes (de cada um dos potenciais doadores) ou de 4 amostras de biópsias de dois pacientes adultos (2 replicatas de cada um, colhidas em dias diferentes).

De posse dos dados de microbioma favoráveis à utilização de suas fezes para a produção de cápsulas, D7 foi encaminhada para avaliação clínica, em que não foi constatado nenhum problema de saúde impeditivo à doação de fezes. Assim, ela então se submeteu à bateria de exames laboratoriais preconizada por bancos de fezes de referência, tais como o OpenBiome. Estes exames avaliam 1) parâmetros sérios de função orgânica como níveis de creatinina, bem como títulos de anticorpos contra agentes infecciosos, 2) ovos de parasitos, 3) genes ou sequências crípticas de patógenos, incluindo marcadores de resistência a drogas e 4) culturas diretas para bactérias.

O protocolo recomenda o início da colheita das fezes e produção das cápsulas, quando da liberação dos resultados destes exames, caso eles atestem a saúde de D7 e segurança de suas fezes para transferência aos pacientes. O efetivo uso das cápsulas para os ensaios clínicos é aprovado somente depois da realização de uma segunda bateria de exames, decorridos 60 dias após a primeira bateria. Para D7, foi realizada a primeira bateria de exames foi realizada no dia 05/05/2022, sendo os resultados apresentados na tabela do ANEXO 5. Como pode ser visto nesta tabela, a candidata apresentou resultado positivo para SARS-CoV-2, por RT-PCR de swab nasofaríngeo, mas resultado negativo para o mesmo agente, nas fezes. Simultaneamente

com estes resultados, D7 apresentou níveis elevados de proteína C reativa. A colheita de fezes precisou ser adiada por 40 dias a partir da data da liberação dos dados da primeira bateria de exames. Assim sendo, novos testes para SARS-CoV-2 e para proteína C reativa foram realizados (em 20/6/2022). O teste de Covid-19 apresentou resultado negativo, tanto no swab nasofaríngeo, quanto nas fezes e o nível sérico de proteína C reativo retornou a um valor considerado normal. A colheita de fezes para a produção em série de cápsulas foi então iniciada logo após, conforme detalhado abaixo.

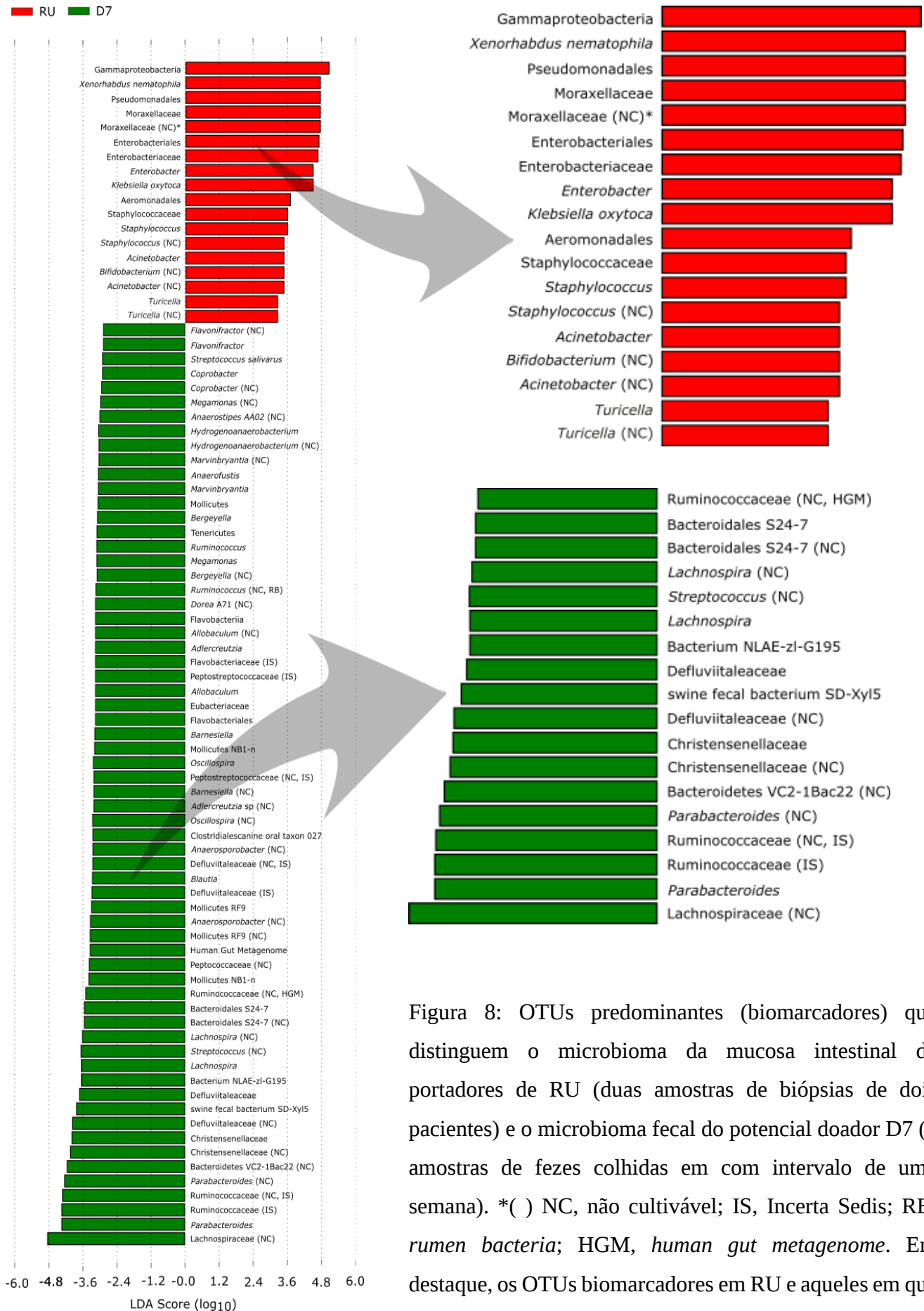


Figura 8: OTUs predominantes (biomarcadores) que distinguem o microbioma da mucosa intestinal de portadores de RU (duas amostras de biópsias de dois pacientes) e o microbioma fecal do potencial doador D7 (3 amostras de fezes colhidas em com intervalo de uma semana). *() NC, não cultivável; IS, Incerta Sedis; RB, rumen bacteria; HGM, human gut metagenome. Em destaque, os OTUs biomarcadores em RU e aqueles em que se observam as maiores diferenças em D7.

4.2.3 Produção em série de cápsulas

Assim que os testes de SARS-Cov-2 deram resultados negativos, tanto no swab nasofaríngeo quanto nas fezes e os níveis de proteína C reativa sérica apresentaram valores normais, iniciou-se a colheita de fezes para a produção de cápsulas em série, seguindo o protocolo Z detalhado na página 34. Tem-se como objetivo a produção de 15 a 20 mil cápsulas, que deverão ser estocadas por até 6 meses e serão destinadas a um ensaio clínico de modulação da microbiota intestinal de portadores de RU atendidos no HC da Unesp.

A rotina de colheita de fezes e produção de cápsulas foi bastante irregular, tendo em vista variações no trânsito intestinal da doadora, alterações na consistência das fezes (para um valor fora do intervalo 3-4 da escala de Bristol, requerido para o processamento das fezes), período menstrual, oscilações comportamentais e mesmo disposição para a doação. Em estrita observância à questão ética, a doação foi sempre feita de maneira integralmente espontânea.

Como consequência dos fatores acima, a colheita de fezes, planejada para acontecer uma vez por dia, 5 dias por semana, só foi possível, em média, 2 vezes por semana, com uma média de 85 ± 15 gramas de fezes por colheita. Após o processamento e mistura com a manteiga de cacau e glicerol, cada grama de fezes rendeu em média $1,8 \pm 0,19$ cápsulas, sem contar a perda por falhas na encapsulação ou problemas na estrutura dos invólucros. Esta perda girou em torno de 15%.

Além das cápsulas produzidas, são também estocadas amostras de fezes de cada colheita diária, para controle de qualidade, que inclui a análise de microbioma. Com os dados das colheitas realizadas para os testes-piloto, bem como para a produção em série de cápsulas foi possível ter uma ideia da variação do microbioma ao longo do tempo e eventualmente a determinação de um *core microbiome*. Deste modo, considerando-se as três amostras usadas para avaliação de D7, como parte do processo de seleção de doadores de fezes e 8 amostras das colheitas para produção em série verificou-se, conforme já previsto, que o microbioma fecal é formado majoritariamente por bactérias. Os fungos – encontrados em minora – foram representados quase que exclusivamente por *Sacharomyces cerevisiae*, com uma média de 17 ± 5 sequências de ITS2 características por amostra. Levando-se em consideração os OTUs predominantes, o *core microbiome* de D7 neste período de colheita (que incluiu amostras de Março e de Julho de 2022 – 11 amostras, no total) consistiu dos seguintes OTUs: *Faecalibacterium* (636 ± 318 sequências), *Lachnospiraceae* (799 ± 411 sequências), *Blautia*

(703±440 sequências) e *Bacteroides* (407±216 sequências), todos os quais não cultiváveis (NC). A prevalência de cada um destes OTUs variou de 19 a 30% (figura 9A).

Os mesmos OTUs encontrados no *core microbiome* das fezes foram detectados em cápsulas com as quais foram produzidas, embora em menor proporção, na maioria deles (Número médio de sequências de *Faecalibacterium*: - 556±155, Lachnospiraceae - 650±140, *Blautia* 636±212 e *Bacteroides* - 466±239) (figura 9B). Porém, essas diferenças de abundância de OTUs entre cápsulas e fezes não foram estatisticamente significativas. Quatro outros OTUs foram encontrados em estas oito amostras de cápsulas (Número de sequências: *Prevotella* - 299±142, Lachnospiraceae Incerta Sedis - 380±104, Ruminococcaceae - 411±110 e Ruminococcaceae Incerta Sedis - 212±52).

Comparando-se o *core microbiome* das cápsulas com OTUs predominantes do microbioma fecal de dois pacientes com RU candidatos a participar do estudo clínico onde tais cápsulas serão empregadas, verificou-se, no *core microbiome* fecal destes dois pacientes, ausência de *Faecalibacterium*, 40% da abundância média de *Blautia* e 50% da abundância de Lachnospiraceae encontrada nas cápsulas. Estas diferenças, porém, não foram significativas estatisticamente.

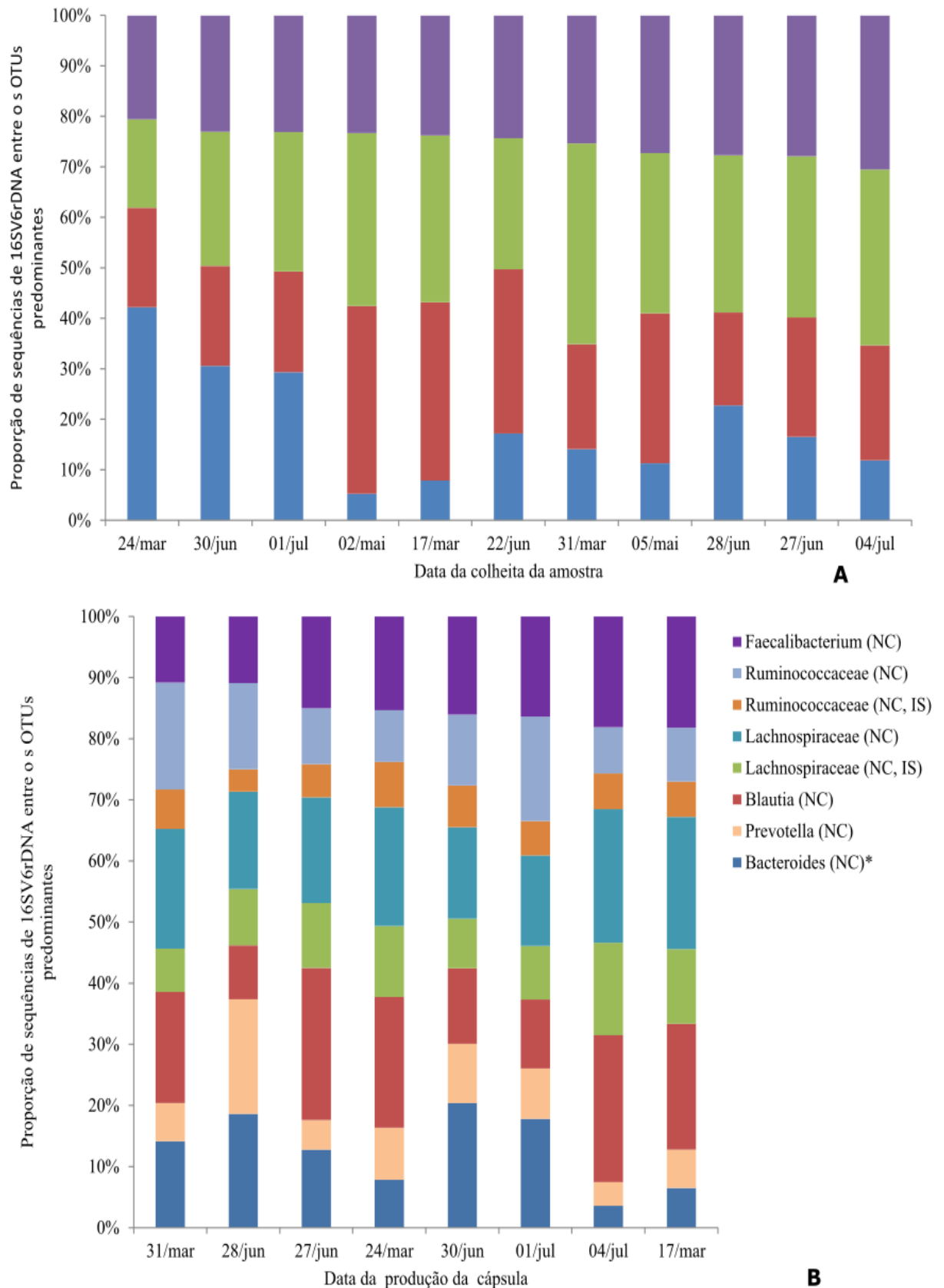


Figura 9: Variação na prevalência de OTUs pertencentes ao *core microbiome* das fezes (A) e das cápsulas (B) entre aqueles predominantes em onze amostras de fezes coletadas em dias distintos e oito de cápsulas. A ordem na figura (da esquerda para a direita) segue a evolução do número de sequências de *Faecalibacterium*. * () NC, não cultivável; IS, Incerta Sedis.



DISCUSSÃO

5. Discussão

O papel da microbiota intestinal na manutenção da homeostase do organismo tem ficado claro, há muito tempo, pela associação da disbiose local com várias patologias, envolvendo não apenas o intestino, mas também diferentes órgãos e tecidos extra intestinais [36]. O uso de pré e probióticos visa contribuir para a restauração do equilíbrio na composição de espécies do intestino, tendo sido empregado com sucesso no tratamento de diarreias [135]. As formulações de probióticos incluem uma ou poucas espécies de microrganismos, obtidos em culturas artificiais e liofilizados [136]. Entretanto, um grande número de espécies da microbiota intestinal que possui um papel modulador importante não é cultivável [137]. De modo que a transferência do conjunto da microbiota fecal por TF, que inclui espécies não cultiváveis, tem sido uma abordagem eficiente na restauração da normobiose e tratamento de doenças, tais como a diarreia por *C. difficile* recorrente ou refratária a antibioticoterapia [59].

A TF pode ser realizada por meio de sondas colonoscópicas ou enemas, diretamente no cólon, bem como por via nasogástrica, procedimentos estes que utilizam suspensões diluídas de fezes e exigem a internação, para o acompanhamento mais próximo do paciente [77]. A TF, mediante a ingestão de cápsulas, é uma alternativa não invasiva que elimina a necessidade de internação dos pacientes [82]. Considerando-se que pouca informação é disponível na literatura sobre protocolos de TF, utilizando-se de cápsulas de administração oral, este trabalho teve como objetivo definir um protocolo que possibilitasse enfrentar os desafios técnicos de processamento das fezes, garantir a segurança de pacientes eventualmente participantes de ensaios clínicos onde fossem aplicadas e que minimizasse a perda microbiana, por conta do processamento, bem como durante a estocagem.

Simultaneamente com os objetivos acima apresentados, o trabalho teve como foco avaliar os desafios envolvidos no processo de seleção de doadores de fezes, qualificados não apenas no sentido de garantir a segurança e eficácia do material a ser produzido, mas que apresentasse um perfil, de modo a não comprometer sua produção em série. A medida destes desafios pode ser vista pela proporção de elegíveis entre os candidatos à doação: (apenas 1 entre 221 que se apresentaram – 0,45%). A experiência obtida possibilitou uma série de aprendizados comentados a seguir.

Um dos aprendizados seria a necessidade de restringir o público alvo à população local, adequando-se o formulário da entrevista para contemplar apenas residentes temporários (estudantes em sua maioria) ou permanentes de Botucatu, tendo em vista a questão logística

para a colheita de amostras biológicas para os exames de triagem e, eventualmente, de fezes para a produção em série de cápsulas no caso de o candidato ser selecionado. Outro ponto de ajuste importante foi a divisão das questões da entrevista em duas partes: aquelas para a coleta de informações não sujeitas ou minimamente sujeitas a alterações e aquelas de natureza temporária, variáveis ou reversíveis. O formulário com a primeira categoria de perguntas foi aplicado primeiro, e tinha caráter eliminatório, por coletar dados, por exemplo, sobre o diagnóstico de doenças crônicas, dependência química e faixa etária. Indivíduos selecionados nesta primeira entrevista eram apresentados ao segundo questionário, que incluía perguntas tais como o diagnóstico de certas doenças infecciosas, como diarreia aguda, ocorrência de viagens para regiões endêmicas e acidentes com materiais perfurocortantes, e perguntas para obter informações sobre os hábitos intestinais (frequência) e faixa de horário de evacuação. Uma vez selecionada pelos critérios da entrevista, a candidata D7 se submeteu aos exames laboratoriais periódicos, para atestar sua saúde e ausência de patógenos microbianos e ovos de parasitos, em suas fezes, sendo qualificada para a doação de fezes, após a repetição de alguns exames positivados na primeira bateria realizada.

Conforme a triagem acima, a candidata foi qualificada em termos de segurança para a doação. Faltava obter informações sobre seu microbioma, quanto ao potencial de restaurar a normobiose intestinal por TF, em eventuais receptores de suas fezes. Foi realizada então uma análise comparativa de triplicatas de seu microbioma fecal com um número equivalente de outros dois candidatos à doação, bem como de duplicatas do microbioma de mucosa de dois pacientes com RU. Embora as amostras de fezes de D7 apresentou uma maior média de diversidade alfa em relação às amostras dos outros indivíduos, a diferença não foi estatisticamente significativa. O gráfico de LEfSe da figura 8 mostra uma grande diferença no microbioma de D7 e RU, respectivamente com Lachnospiraceae e Gammaproteobacteria nos extremos (score de LDA, 4,8). Ao passo que Lachnospiraceae é uma família que inclui um grande número de bactérias simbiotes clássicas da microbiota humana ^[5], Gammaproteobacteria é amplamente reconhecida pela alto número de representantes suspeitos de associação com patologias humanas, que inclui *Escherichia coli*, por muito tempo apontada como causa ou complicadora dos sintomas de RU ^[138] e Succinovibrionaceae, associada a Síndrome de Behçet ^[139]. Além de Lachnospiraceae, D7 apresenta um grande número de outros biomarcadores da microbiota saudável, como Rumminococcaceae e Christensenellaceae ^[140], ausentes em RU, mostrando um evidente quadro de disbiose nesta última. Estes resultados ressaltam a importância da análise de microbioma no sentido de se atentar não apenas para as bactérias simbiotes, mas também para aquelas com possível associação com doenças. Na

verdade, neste trabalho, um dos candidatos à doação de fezes (D2) e que preencheu grande parte dos critérios da triagem, apresentou alteração na enzima hepática ALT. Análise comparativa de seu microbioma mostrou que, enquanto os demais candidatos não possuíam ou apresentavam apenas “traços” de sequências de 16SV6rDNA de *Succinovibrionaceae*, esta família estava entre as dominantes do microbioma de D2. *Succinovibrionaceae* está possivelmente associada a causa de uveíte na síndrome de Behçet ^[139].

Conforme mencionado na seção “Resultados”, aproveitou-se as amostras de fezes coletadas para a análise de microbioma, para também testar protocolos de processamento de fezes, visando abordar questões técnicas de manuseio e avaliação da perda microbiana por processamento e estocagem. Foram testados 4 protocolos de produção de cápsulas, 3 dos quais contendo manteiga de cacau em sua fórmula, sendo que o único que não apresentava este ingrediente resultou em perda de abundância microbiana, que variou de -70 a -90%, nos OTUs representativos (≥ 100 sequências de 16SV6rDNA), em 35 dias de criopreservação e não possibilitou o envase dos invólucros.

Nos protocolos contendo manteiga de cacau, em testes realizados com até quase um ano de estocagem, considerando-se apenas os OTUs representativos, nem todos OTUs apresentaram menor abundância nas cápsulas do que nas fezes e, entre aqueles onde a abundância foi menor nas cápsulas, a diferença para menos nas cápsulas foi menor. Porém, ressalta-se que estas diferenças não foram significativas estatisticamente, o que pode sugerir pouca ou nenhuma variação no microbioma, durante a estocagem.

Dois dos protocolos que empregaram manteiga de cacau apresentaram limitações técnicas. O protocolo X produzia uma emulsão que comprometia a estrutura das DRcaps, impedindo seu fechamento. Uma possível explicação para este problema é a presença de salina, que, aparentemente poderia ser corrigido com o aumento da proporção de glicerol em relação à salina, ou a completa eliminação desta da formulação (com base em testes realizados – dados não mostrados). Optou-se pela segunda alternativa, eliminando completamente a salina do protocolo. Assim, criou-se o terceiro protocolo, cuja emulsão consistia apenas de fezes + manteiga de cacau + glicerol (na proporção 5:4:1). No entanto, esta fórmula apresentou um baixo rendimento, em função da perda de material no saco de homogeneização. Consequentemente, a emulsão passou a ser produzida em um béquer, pela mistura, com o auxílio de um bastão, da manteiga de cacau/glicerol às fezes previamente peneiradas numa malha de retenção de 1 mm criando-se o quarto protocolo (protocolo Z). A mistura final a ser envasada era produzida pela passagem, através de uma peneira de 300 μm da emulsão

homogeneizada no béquer. A passagem por esta peneira, além de possibilitar a retenção de resíduos, favoreceria a quebra de partículas e mistura adicional dos componentes, contribuindo para uma boa consistência e fluidez para o carregamento das seringas e distribuição do conteúdo nos invólucros. Vale mencionar que, para o sucesso do emprego deste protocolo, as fezes deveriam apresentar consistência de grau 3 ou 4 na escala de Bristol ^[123]. Este protocolo, que não apresentou qualquer limitação técnica, foi escolhido para a produção em série de cápsulas.

Conforme os dados apresentados, observou-se perda no número e abundância de OTUs durante o processamento seguindo este protocolo. Porém não foi observada variação estatisticamente significativa nestes parâmetros, durante a estocagem das cápsulas até 124 dias. Além disso, pode-se observar uma maior perda do número de OTUs no microbioma das fezes estocadas a -80°C, por 124 dias, do que no microbioma das cápsulas mantidas pelo mesmo período e nas mesmas condições.

Considerando-se apenas os OTUs representativos, numa análise de variação ao longo do tempo, observa-se que as menores variações na abundância entre cápsulas estocadas por 124 dias e fezes estocadas por 3 dias são de OTUs com maior número de sequências (*Lachnospiraceae*, *Faecalibacterium* e *Blautia*). Estes OTUs fazem parte do *core microbiome* da doadora D7, com cujas amostras foram feitas estas análises. Esta constatação, bem como o fato de *Faecalibacterium* não ser encontrada no microbioma fecal de duas pacientes com RU pode ser um indicativo de algum grau de eficácia destas cápsulas na restauração da microbiota de portadores de RU que eventualmente venham recebê-las.

Vale lembrar que as observações acima relativas à abundância se baseiam na quantificação no número de sequências de OTUs, que podem não refletir com segurança o dado real. Por isto, para se chegar uma conclusão mais confiável sobre os resultados discutidos acima seria necessária a quantificação de pelo menos alguns destes grupos microbianos, com técnicas tais como Real time PCR (qPCR) ou citometria de fluxo. Os achados deste trabalho, no entanto podem servir como ponto de partida para avaliações futuras com estas metodologias.

Embora dados da literatura não sejam completos em relação aos componentes de cápsulas de TF de uso oral, a importância da manteiga de cacau para a preservação da microbiota fecal durante a estocagem em baixa temperatura é conhecida há bastante tempo ^[92]. Conforme já mencionado, o protocolo definido como ideal neste estudo está sendo utilizado para a produção em série de cápsulas que estão sendo estocadas a -80°C e cujo microbioma está

sendo determinado. Estas cápsulas deverão ser utilizadas em um estudo clínico duplo cego para a modulação do microbioma de portadores de RU atendidos no HC-Unesp. A expectativa é que este estudo possibilite avaliar a real eficácia das mesmas em contribuir para a melhora clínica destes indivíduos. As cápsulas estocadas contém invólucro de gelatina e, no momento estão em quarentena, até a realização de uma segunda bateria de exames (os mesmos apresentados aqui) em D7. Assim que os resultados destes exames forem liberados e, caso não haja qualquer restrição, as cápsulas 0 serão introduzidas em DRcaps 00, que serão administradas aos pacientes, num regime de 20 cápsulas por semana, durante 8 semanas.



CONCLUSÕES

6. Conclusões

A TF é um procedimento milenar, ainda considerado alternativa para a modulação da microbiota intestinal, visando controlar sintomas de doenças que têm como base a disbiose no intestino. A razão do seu uso é a existência de inúmeras bactérias, majoritariamente não cultiváveis e com potencial de modulação no intestino de pessoas saudáveis que podem ser transferidas para o sítio equivalente de indivíduos que apresentam disbiose. Para isto, é imperativo encontrar um doador cujo material fecal a ser doado preencha os requisitos de segurança e eficácia. Procurou-se abordar estes dois elementos, neste trabalho, sendo que o desafio de seleção de indivíduos para colaborar como doador foi além do imaginado quando da idealização deste projeto. Para garantir seu sucesso, o processo de seleção, em particular tem que tratar de questões da intimidade do indivíduo, variações biológicas naturais e disposição, afora a necessidade da triagem para a detecção de uma variedade de tipos de patógenos, doenças crônicas e condições não necessariamente ligadas a doenças, que podem influir na composição de espécies da microbiota. Como resultado, o processo é caro, moroso e de desfecho incerto. Possivelmente, uma forma de mitigar estes desafios é a promoção de alguma campanha de conscientização sobre a importância dos microrganismos, seu papel e influência sobre o funcionamento do organismo, bem como o quanto produzimos e que eventualmente pode ser usado no controle de doenças.

A definição de um protocolo de produção de cápsulas possibilitou a sua realização em série e aquisição de conhecimento que poderá ter aplicações variadas. Estas cápsulas terão sua eficácia testada em um estudo clínico com pacientes portadores de RU. Porém, poderão ser utilizadas para o tratamento de diarreias refratárias a antibioticoterapia e outras doenças. Uma possível aplicação alternativa seria a produção de cápsulas com fezes de indivíduos saudáveis que eventualmente necessitem de intervenções que demandem um regime de ingestão de antibióticos. Produzindo-se e estocando-se, previamente ao início do regime, cápsulas com as fezes dos próprios indivíduos, elas podem ser utilizadas ao final do regime para a restauração da microbiota possivelmente disbiótica pela ação massiva dos antibióticos ingeridos.



ANEXOS

7. Anexos

I. ANEXO 1

Questionário para seleção de doadores para transplantação fecal.

Categoria	Perguntas
1) Dados pessoais e residência	1. Nome 2. Ano de nascimento 3. Sexo 4. Telefone para contato 5. Reside em - a) Botucatu; b) outra cidade, mas estuda em Botucatu 6. O seu peso (em kg) é de aproximadamente: 7. A sua altura (em metros) é de: 8. Se você for estudante e não reside em Botucatu, você ficará em Botucatu por: a) menos de 6 meses; b) 6 meses a 1 ano; c) mais de 1 ano
2) Medicação	9. Faz uso rotineiro de alguns dos medicamentos abaixo? a) omeprazol ou similares; b) corticoides ou similares; c) quimioterápicos; d) não faço uso dos medicamentos acima
3) Condição de saúde	10. Apresenta ou apresentou alguma das doenças ou infecções abaixo? a) câncer gastrointestinal; b) síndrome do intestino irritável; c) doença inflamatória intestinal; d) doença celíaca; e) diarreia crônica ou outro tipo de infecção gastrointestinal crônica; f) polipose intestinal; g) doença autoimune; h) diabetes; i) distúrbios cardiovasculares; j) aterosclerose; l) doença neurológica m) depressão; n) esquizofrenia; o) autismo; p) doença atópica; q) dores crônicas; r) por HIV; s) sífilis; t) hepatite B e/ou C; u) covid-19; v) nenhuma doença relacionada acima 11. Tem alguma doença não listada acima? Se sim, qual? 12. Foi hospitalizado nos últimos 6 meses? 13. Caso você tenha respondido sim na pergunta anterior, assinale qual alternativa melhor reflete o seu período de internação: a) menos que

uma semana; b) de uma a duas semanas; c) de duas a quatro semanas; mais de um mês

14. Apresentou vômito, diarreia, disenteria devido infecção gastrointestinal há menos de 2 meses?

4) histórico familiar relacionado a saúde

15. Possui algum parente de até 2º grau que apresenta ou apresentou alguma das doenças abaixo? a) câncer gastrointestinal; b) síndrome do intestino irritável; c) doença inflamatória intestinal; d) doença celíaca; e) polipose intestinal; f) doença autoimune; g) diabetes; h) distúrbios cardiovasculares; i) aterosclerose; j) doença neurológica; l) depressão; m) esquizofrenia; n) autismo; o) doença atópica; p) dores crônicas; q) COVID-19; r) nenhuma doença relacionada acima

5) Trânsito e hábito intestinal

16. Assinale abaixo qual alternativa melhor descreve a sua frequência de evacuação: a) 1 a 2 vezes por dia; b) de 5 a 6 vezes por semana; c) menos que 5 vezes por semana; d) não sei

17. Por gentileza, escolha, dentre os intervalos de horário abaixo, aquele que melhor se aproxima daquele em que você evacua, durante o dia: a) Entre 6 e 8hs; b) Entre 8 e 10h; c) Entre 10 e 12h; d) Entre 12 e 14h; e) Entre 14 e 16h; f) Após as 16h; g) Não tenho uma faixa horária definida (é variável, pode ser de manhã, à tarde ou à noite)

6) Condição de risco de saúde

18. Faz uso de algum tipo de droga ilícita?

19. Possui múltiplos parceiros sexuais?

20. Mantém relação sexual com pessoas que sabidamente possuem HIV, sífilis, hepatite B ou C?

21. Alguma vez recebeu transplante de tecidos ou órgãos?

22. Teve acidente com material perfurocortante nos últimos 6 meses?

23. Viajou nas últimas semanas para locais onde há surto de alguma doença?

24. Caso tenha respondido afirmativamente à questão anterior, informe qual a doença e a região?

25. Fez tatuagem, colocou piercing ou brinco há menos de 6 meses?

7) Tipo de dieta

26. Possui dieta: a) vegetariana; b) vegana; c) variada

8) Vacinação	27. Assinale na lista abaixo a(s) vacina(s) que você tomou nos últimos 2 meses: a) tétano e difteria (dT); b) sarampo, c) caxumba e rubéola (tríplice viral); d) sarampo e rubéola (dupla viral); e) febre amarela; f) hepatite B; g) coronavac 1º dose; h) coronavac; i) 2º dose coronavac; j) coronavac 3º dose; l) AstraZeneca 1º dose m) AstraZeneca 2º dose n) AstraZeneca 3º dose ; o) Pfizer 1º dose; p) Pfizer 2º dose; q) Pfizer 3º dose; r) nenhuma das vacinas acima
--------------	---

II. ANEXO 2

Exames laboratoriais realizados na seleção de doadores.

Tipo de exame	Metodologia
Adenovírus F40/F41	PCR em tempo real multiplex
Albumina	Colorimétrico (VBC) automatizado
Anticorpos contra HTLV I/II	Quimioluminescência
Anticorpos totais contra Hepatite C	Quimioluminescência
Anticorpos totais contra Sífilis	Quimioluminescência
Antígeno de Hepatite B	Quimioluminescência
Antígenos e anticorpos contra HIV 1 e 2	Quimioluminescência - imunoensaio de 4ª geração
Antígenos para <i>Helicobacter pylori</i>	Imunocromatografia
Astrovírus	PCR em tempo real multiplex
Bactérias produtoras de carbapenemases	Cultura em meios específicos
Bactérias produtoras de ESBL	Cultura em meios específicos
Bilirubina total	Colorimétrico automatizado
Calprotectina fecal	Enzimaimunoensaio
<i>Campylobacter</i> sp.	PCR em tempo real multiplex
Cistos de protozoários, ovos ou larvas de helmintos	Paratest - formalina 5%/ HOFFMAN
<i>Clostridium difficile</i> (toxina) A/B	PCR em tempo real multiplex
Creatinina	Cinética colorimétrica automatizado
<i>Cryptosporidium</i> sp.	PCR em tempo real multiplex
<i>E.coli</i> enteroagregativa (EAEC)	PCR em tempo real multiplex
<i>E.coli</i> enteropatogenica (EPEC)	PCR em tempo real multiplex
<i>E.coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	PCR em tempo real multiplex
<i>E.coli</i> O157	PCR em tempo real multiplex
<i>E.coli</i> toxina de Shiga (<i>stx1/stx2</i>)	PCR em tempo real multiplex
<i>Entamoeba histolytica</i>	PCR em tempo real multiplex
<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina	Cultura específica e automação
Fosfatase alcalina	Cinético automatizado
<i>Giardia lamblia</i>	PCR em tempo real multiplex
Hemograma (Basófilos)	Automatizado
Hemograma (Bastonetes)	Automatizado
Hemograma (C.H.C.M)	Automatizado
Hemograma (Eosinófilos)	Automatizado
Hemograma (H.C.M)	Automatizado
Hemograma (hemácias)	Automatizado
Hemograma (hematócrito)	Automatizado
Hemograma (hemoglobina)	Automatizado
Hemograma (Leucócitos)	Automatizado
Hemograma (Linfócitos)	Automatizado
Hemograma (Metamielócitos)	Automatizado

Tipo de exame	Metodologia
Hemograma (Mielócitos)	Automatizado
Hemograma (Monócitos)	Automatizado
Hemograma (Plaquetas)	Automatizado
Hemograma (R.D.W)	Automatizado
Hemograma (Segmentados)	Automatizado
Hemograma (V.C.M)	Automatizado
IgG contra <i>Strongyloides stercoralis</i>	Enzimaimunoensaio
IgG contra Hepatite B	Quimioluminescência
IgM contra citomegalovírus	Quimioluminescência
IgM contra Epstein Barr	Quimioluminescência
IgM contra Hepatite A	Quimioluminescência
IgM contra Hepatite B	Quimioluminescência
IgM contra Hepatite E	ELISA
Norovírus GI/GII	Automatizado
Proteína c reativa	Imunoturbidimetria
Rotavírus	PCR em tempo real multiplex
<i>Salmonella</i> sp.	PCR em tempo real multiplex
Sapovírus	PCR em tempo real multiplex
SARS-CoV-2 fezes	PCR em tempo real multiplex
SARS-CoV-2 nasofaríngeo	PCR em tempo real multiplex
<i>Shigella/E.coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Automatizado
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina	Cultura específica e automação
<i>Staphylococcus</i> resistente à oxacilina	Semeadura em meios específicos
Transaminase oxalacética	Cinético (UV) automatizado
Transaminase pirúvica	Enzimático automatizado
<i>Vibrio cholerae</i>	PCR em tempo real multiplex
<i>Vibrio</i> sp.	PCR em tempo real multiplex
<i>Yersina enterocolítica</i>	PCR em tempo real multiplex

III. ANEXO 3

Slides com as instruções para a colheita de fezes do doador.

DOADOR

INSTRUÇÕES PARA A COLHEITA DE FEZES





ANTES DE REALIZAR A COLHEITA, LEIAS ÀS PERGUNTAS A SEGUIR :



Nos últimos dias, você:

1. Apresentou **sintomas gastrointestinais** (por exemplo, diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, icterícia)?
2. Apresentou **sinais de infecção** (por exemplo, febre ou linfonodos inchados)?
3. Usou **antibióticos, corticoides, fungicidas e vermífugos**?
4. Teve **relações sexuais desprotegidas** com novos parceiros desde a última triagem?
5. **Viajou** para áreas de surto de alguma doença?
6. Teve acidente com **perfurocortante**?



7. Foi hospitalizado?
8. Tomou alguma das vacinas abaixo?
 - Triplice viral (sarampo, caxumba e rubéola);
 - Dupla viral (sarampo e rubéola);
 - Febre amarela;
 - Varicela;
 - Sarampo;
 - Caxumba;
 - Rubéola;
 - Dengue.
9. Fez tatuagem, colocou piercing ou brinco há menos de 6 meses?
10. Utilizou algum tipo de droga ilícita?



Caso responda **AFIRMATIVAMENTE** a alguma delas, nos avise.



Caso responda **NEGATIVAMENTE** para todas elas, faça a colheita de acordo com as instruções a seguir.



ATENÇÃO!

É muito importante realizar a colheita corretamente para garantir que não haja contaminação da amostra!

01 LIMPE SEU VASO SANITÁRIO E O APARATO

O vaso deve estar limpo internamente e em sua superfície. Borrife Lysoform no vaso sanitário inteiro e no aparato (**sem o pote**). Deixe agir por 10 minutos e seque o assento e o aparato com um pano limpo. Não precisa enxaguar.



02 LAVE MUITO BEM AS MÃOS COM ÁGUA E SABÃO



03 ESVAZIE A BEXIGA

Atenção! A amostra de fezes não deverá ter contato com a urina!



04 ACOUPLE O APARATO JUNTAMENTE COM O POTE COLETOR NO VASO SANITÁRIO



05 EVACUE DENTRO DO POTE COLETOR



06 COLOQUE O POTE DENTRO DO SACO PLÁSTICO E O ACONDICIONE NA CAIXA DE ISOPOR COM O GELO RECICLADO



07 ENTRE EM CONTATO

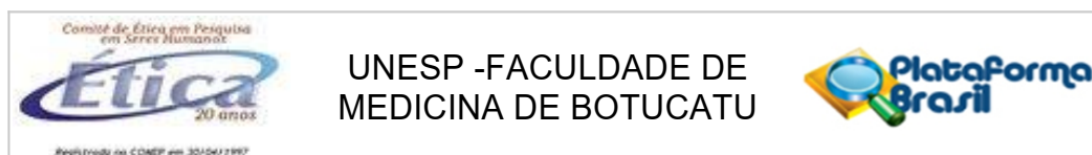


Logo após armazenar o material coletado devidamente no isopor, entre imediatamente em contato com a equipe do estudo pelo telefone:

 (14) 981026657

IV. ANEXO 4

Parecer consubstanciado do CEP- UNESP-Faculdade de Medicina de Botucatu.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modulação do Microbioma do Intestino de Portadores de Retocolite Ulcerativa através de Transplantação Fecal

Pesquisador: JOSIAS RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01681518.3.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.009.218

Apresentação do Projeto:

Adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia da transplantação fecal na melhora clínica de portadores de retocolite ulcerativa, após o uso intensivo, por via oral, de pílulas contendo fezes de doadores saudáveis.

Objetivos específicos: determinar a composição de espécies bacterianas, parâmetros físico-químicos e imunológicos do material fecal de doadores de fezes; classificar as amostras fecais segundo parâmetros de saúde, diversidade e abundância de espécies bacterianas, que, de acordo com a literatura, têm contribuição favorável à remissão da retocolite ulcerativa; processar e estocar as fezes em baixa temperatura, de modo a preservar suas características, em particular a viabilidade bacteriana, em cápsulas; fazer o acompanhamento da variação do microbioma intestinal, parâmetros clínicos e de qualidade de vida de portadores de retocolite ulcerativa submetidos à transplantação fecal pela ingestão diária de pílulas contendo fezes de múltiplos doadores.

Serão selecionados 32 pacientes de ambos os sexos, com 18 a 60 anos de idade, atendidos no HC da UNESP, com retocolite ulcerativa há pelo menos quatro meses, apresentando atividade clínica e endoscópica com escore de Mayo entre 3 e 10 e subscore (Mayo endoscópico) de 1,0.

De acordo com randomização, os indivíduos receberão, cápsulas contendo fezes concentradas.

V. ANEXO 5

Resultados da primeira etapa de exames laboratoriais para atestar a saúde do doador D7.

Tipo de exame	Material Clínico	Resultado	Unidade	Data do exame	Valores de Referência
Adenovírus F40/F41	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
Albumina	Soro	5	g/dL	02/05/2022	3,5 - 5,2
Anticorpos contra HTLV I/II	Soro	0,05	não se aplica	02/05/2022	< 1,0
Anticorpos totais contra Hepatite C	Soro	0,1	não se aplica	02/05/2022	< 1,0
Anticorpos totais contra Sífilis	Soro	0,04	não se aplica	02/05/2022	< 1,0
Antígeno de Hepatite B	Soro	0,3	não se aplica	02/05/2022	< 0,9
Antígenos e anticorpos contra HIV 1 e 2	Soro	0,05	não se aplica	02/05/2022	< 1,0
Antígenos para <i>Helicobacter</i>	Fezes	Negativo	não se aplica	02/05/2022	Negativo
Astrovírus	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
Bactérias produtoras de Carbapenemases	Fezes	Negativo	não se aplica	05/05/2022	Negativo
Bactérias produtoras de ESBL	Fezes	Negativo	não se aplica	04/05/2022	Negativo
Bilirubina total	Soro	0,46	mg/dL	02/05/2022	< 1,2
Calprotectina fecal	Fezes	< 5	mg/Kg	20/06/2022	< 50 µg/g
<i>Campylobacter</i> sp.	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
Cistos de protozoários, ovos ou larvas de helmintos	Fezes	Negativo	não se aplica	02/05/2022	Negativo
Cistos de protozoários, ovos ou larvas de helmintos	Fezes	Negativo	não se aplica	05/05/2022	Negativo
Cistos de protozoários, ovos ou larvas de helmintos	Fezes	Negativo	não se aplica	12/05/2022	Negativo

Tipo de exame	Material Clínico	Resultado	Unidade	Data do exame	Valores de Referência
<i>Clostridium difficile</i> (toxina) A/B	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Creatinina</i>	Soro	0,66	mg/L	02/05/2022	0,40 a 1,10
<i>Cryptosporidium</i> sp.	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>E.coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>E.coli</i> enteropatogenica (EPEC)	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>E.coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>E.coli</i> O157	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>E.coli</i> toxina de Shiga (stx1/stx2)	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Entamoeba histolytica</i>	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
Fosfatase alcalina	Soro	37	U/L	02/05/2022	27 -100
<i>Giardia lamblia</i>	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
Hemograma (Basófilos)	Sangue total EDTA	9	/mm3	02/05/2022	0 - 300
Hemograma (Bastonetes)	Sangue total EDTA	0	/mm3	02/05/2022	< 840
Hemograma (C.H.C.M)	Soro	31,7	%	02/05/2022	31,0 - 36,0
Hemograma (Eosinófilos)	Sangue total EDTA	223	/mm3	02/05/2022	50 - 500
Hemograma (H.C.M)	Soro	26,4	pg	02/05/2022	26,0 - 34,0
Hemograma (hemácias)	Soro	4,2	milh/mm3	02/05/2022	3,90 - 5,00
Hemograma (hematócrito)	Soro	35	%	02/05/2022	35,0 - 45,0
Hemograma (hemoglobina)	Soro	11,1	g%	02/05/2022	12,0 - 15,5
Hemograma (Leucócitos)	Sangue total EDTA	9310	/mm3	02/05/2022	3500-10500

Tipo de exame	Material Clínico	Resultado	Unidade	Data do exame	Valores de Referência
Hemograma (Linfócitos)	Sangue total EDTA	2989	/mm3	02/05/2022	900 - 2900
Hemograma (Metamielócitos)	Sangue total EDTA	0	/mm3	02/05/2022	0
Hemograma (Metamielócitos)	Sangue total EDTA	0	/mm3	02/05/2022	0
Hemograma (Mielócitos)	Sangue total EDTA	0	/mm3	02/05/2022	0
Hemograma (Monócitos)	Sangue total EDTA	307	/mm3	02/05/2022	300 - 900
Hemograma (plaquetas)	Sangue total EDTA	297000	/mm4	02/05/2022	14000 - 45000
Hemograma (R.D.W)	Soro	12,4	%	02/05/2022	11,9 - 15,5
Hemograma (Segmentados)	Sangue total EDTA	5782	/mm3	02/05/2022	1700 - 7000
Hemograma (V.C.M)	Soro	83,3	u3	02/05/2022	82,0 - 98,0
IgG contra <i>Strongyloides stercoralis</i>	Soro	0,16	não se aplica	02/05/2022	< 1,0
IgM contra Citomegalovírus	Soro	0,43	não se aplica	02/05/2022	< 0,85
IgM contra Epstein Barr	Soro	0,17	não se aplica	02/05/2022	< 0,50
IgM contra Hepatite A	Soro	0,19	não se aplica	02/05/2022	< 0,80
IgM contra Hepatite B	Soro	0,3	não se aplica	02/05/2022	< 1,0
IgM contra Hepatite E	Soro	0,15	não se aplica	02/05/2022	< 0,8
Norovírus GI/GII	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado

Tipo de exame	Material Clínico	Resultado	Unidade	Data do exame	Valores de Referência
Proteína C reativa	Soro	36,65	mg/L	02/05/2022	< 1,0
Proteína C reativa	Soro	0,75	mg/L	20/06/2022	< 1,0
Rotavírus	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Salmonella</i> sp.	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
Sapovírus	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
SARS-CoV-2	Swab nasofaríngeo	Detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
SARS-CoV-2	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
SARS-CoV-2	Swab nasofaríngeo	Não detectado	não se aplica	20/06/2022	Não detectado
SARS-CoV-2	Fezes	Não detectado	não se aplica	20/06/2022	Não detectado
<i>Shigella/E.coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina	Secreção nasal	Negativo	não se aplica	03/05/2022	Negativo
<i>Staphylococcus</i> resistente à Oxacilina	Fezes	Negativo	não se aplica	02/05/2022	Negativo
Transaminase Oxalacética	Soro	19	U/L	02/05/2022	< 37
Transaminase Pirúvica	Soro	23	U/L	02/05/2022	< 38
<i>Vibrio cholerae</i>	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Vibrio</i> sp.	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado
<i>Yersina enterocolítica</i>	Fezes	Não detectado	não se aplica	02/05/2022	Não detectado



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

1. Guinane, C.M. and P.D. Cotter, *Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ*. Therap Adv Gastroenterol, 2013. **6**(4): p. 295-308.
2. Matijašić, M., et al., *Gut Microbiota beyond Bacteria-Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
3. Shreiner, A.B., J.Y. Kao, and V.B.J.C.o.i.g. Young, *The gut microbiome in health and in disease*. 2015. **31**(1): p. 69.
4. Hillman, E.T., et al., *Microbial ecology along the gastrointestinal tract*. 2017: p. ME17017.
5. Rinninella, E., et al., *What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases*. Microorganisms, 2019. **7**(1).
6. Biddle, A., et al., *Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities*. Diversity, 2013. **5**(3): p. 627-640.
7. Liu, X., et al., *Blautia-a new functional genus with potential probiotic properties?* Gut Microbes, 2021. **13**(1): p. 1-21.
8. Nie, K., et al., *Roseburia intestinalis: A Beneficial Gut Organism From the Discoveries in Genus and Species*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 757718.
9. Corrêa, R., et al., *Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids*. Clin Transl Immunol **5**: e73. 2016.
10. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. 2014. **63**(8): p. 1275-1283.
11. Louis, P. and H.J.J.F.m.l. Flint, *Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine*. 2009. **294**(1): p. 1-8.

12. Hansen, J., A. Gulati, and R.B. Sartor, *The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(6): p. 564-71.
13. Mohebbali, N., et al., *Barrier protection and recovery effects of gut commensal bacteria on differentiated intestinal epithelial cells in vitro*. 2020. **12**(8): p. 2251.
14. Clemente, J.C., et al., *The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view*. 2012. **148**(6): p. 1258-1270.
15. Waters, J.L. and R.E. Ley, *The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health*. BMC Biology, 2019. **17**(1): p. 83.
16. Johnson, E.L., et al., *Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes*. J Mol Med (Berl), 2017. **95**(1): p. 1-8.
17. Wexler, A.G. and A.L. Goodman, *An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome*. Nature Microbiology, 2017. **2**(5): p. 17026.
18. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 620-625.
19. Thomas, F., et al., *Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection*. 2011. **2**.
20. Koh, A., et al., *From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites*. 2016. **165**(6): p. 1332-1345.
21. Hiergeist, A., et al., *Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing*. Ilar j, 2015. **56**(2): p. 228-40.
22. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. J Mol Biol, 1975. **94**(3): p. 441-8.
23. Metzker, M.L., *Emerging technologies in DNA sequencing*. Genome Res, 2005. **15**(12): p. 1767-76.
24. Dodd, C.S. and C.E. Grueber, *Functional Diversity within Gut Microbiomes: Implications for Conserving Biodiversity*. Conservation, 2021. **1**(4).

25. Tringe, S.G. and P.J.C.o.i.m. Hugenholtz, *A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene*. 2008. **11**(5): p. 442-446.
26. Delsuc, F., et al., *Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals*. 2014. **23**(6): p. 1301-1317.
27. Huseyin, C.E., et al., *Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease*. 2017. **41**(4): p. 479-511.
28. Nash, A.K., et al., *The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 153.
29. Iliev, I.D. and I. Leonardi, *Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(10): p. 635-646.
30. Schoch, C.L., et al., *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. 2012. **109**(16): p. 6241-6246.
31. Abarenkov, K., et al., *The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives*. 2010. **186**(2): p. 281-285.
32. Ryberg, M., et al., *An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity*. 2009. **181**(2): p. 471-477.
33. Jost, L.J.E., *Partitioning diversity into independent alpha and beta components*. 2007. **88**(10): p. 2427-2439.
34. Lozupone, C., R.J.A. Knight, and e. microbiology, *UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities*. 2005. **71**(12): p. 8228-8235.
35. Segata, N., et al., *Metagenomic biomarker discovery and explanation*. 2011. **12**(6): p. 1-18.
36. DeGruttola, A.K., et al., *Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models*. Inflamm Bowel Dis, 2016. **22**(5): p. 1137-50.
37. Crothers, J., et al., *Tu1893-a double-blind, randomized, placebo-control pilot trial of fecal microbiota transplantation capsules from rationally selected donors in active ulcerative colitis*. 2018. **154**(6): p. S-1050-S-1051.

38. Kobayashi, T., et al., *Ulcerative colitis*. Nat Rev Dis Primers, 2020. **6**(1): p. 74.
39. Kornbluth, A. and D.B. Sachar, *Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(3): p. 501-23; quiz 524.
40. Höie, O., et al., *Ulcerative Colitis: Patient Characteristics May Predict 10-Yr Disease Recurrence in a European-Wide Population-Based Cohort*. Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG, 2007. **102**(8).
41. Hibi, T. and H.J.J.o.g. Ogata, *Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease*. 2006. **41**(1): p. 10-16.
42. Shen, Z.H., et al., *Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(1): p. 5-14.
43. Chassaing, B. and A.J.G. Darfeuille–Michaud, *The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. 2011. **140**(6): p. 1720-1728. e3.
44. Bajer, L., et al., *Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis*. 2017. **23**(25): p. 4548.
45. Halfvarson, J., et al., *Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 17004.
46. Ott, S.J., et al., *Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity*. 2008. **43**(7): p. 831-841.
47. Iliev, I.D., et al., *Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis*. 2012. **336**(6086): p. 1314-1317.
48. Mao, R., et al., *Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis*. 2020. **5**(7): p. 667-678.

49. Leonardi, I., et al., *Fungal Trans-kingdom Dynamics Linked to Responsiveness to Fecal Microbiota Transplantation (FMT) Therapy in Ulcerative Colitis*. Cell Host Microbe, 2020. **27**(5): p. 823-829.e3.
50. Marchioni Beery, R. and S. Kane, *Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis*. Clin Exp Gastroenterol, 2014. **7**: p. 111-32.
51. Mowat, C., et al., *Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults*. Gut, 2011. **60**(5): p. 571-607.
52. Lopez, J. and A. Grinspan, *Fecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2016. **12**(6): p. 374-9.
53. Bakken, J.S., et al., *Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2011. **9**(12): p. 1044-1049.
54. Smits, L.P., et al., *Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation*. Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 946-53.
55. Zhang, F., et al., *Should We Standardize the 1,700-Year-Old Fecal Microbiota Transplantation?* Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG, 2012. **107**(11).
56. Eiseman, B., et al., *Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis*. Surgery, 1958. **44**(5): p. 854-9.
57. van Nood, E., et al., *Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2013. **368**(5): p. 407-15.
58. Borody, T.J., et al., *Bowel-flora alteration: a potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome?* Med J Aust, 1989. **150**(10): p. 604.
59. Rakotonirina, A., T. Galperine, and E. Allémann, *Fecal microbiota transplantation: a review on current formulations in Clostridioides difficile infection and future outlooks*. Expert Opin Biol Ther, 2022. **22**(7): p. 929-944.

60. Khoruts, A., et al., *Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea*. 2010. **44**(5): p. 354-360.
61. Bakken, J.S., et al., *Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(12): p. 1044-9.
62. Gough, E., H. Shaikh, and A.R.J.C.i.d. Manges, *Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent Clostridium difficile infection*. 2011. **53**(10): p. 994-1002.
63. Surawicz, C.M., et al., *Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of clostridium difficile Infections*. 2013. **108**(4): p. 478-498.
64. Food, D.A.J.C.f.B. Evaluation, and Research, *Enforcement policy regarding investigational new drug requirements for use of fecal microbiota for transplantation to treat Clostridium difficile infection not responsive to standard therapies*. 2013.
65. Borody, T.J., et al., *Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy*. 2003. **37**(1): p. 42-47.
66. Kao, D., et al., *Fecal microbiota transplantation inducing remission in Crohn's colitis and the associated changes in fecal microbial profile*. 2014. **48**(7): p. 625-628.
67. Paramsothy, S., et al., *Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis*. Gastroenterology, 2019. **156**(5): p. 1440-1454.e2.
68. Ford, A.C., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis*. 2009. **7**(12): p. 1279-1286.
69. Tian, H., et al., *Treatment of slow transit constipation with fecal microbiota transplantation*. 2016. **50**(10): p. 865-870.
70. Vermeire, S., et al., *Donor species richness determines faecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease*. 2016. **10**(4): p. 387-394.
71. Rossen, N.G., et al., *Findings from a randomized controlled trial of fecal transplantation for patients with ulcerative colitis*. 2015. **149**(1): p. 110-118. e4.

72. Van den Abbeele, P., et al., *Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(15): p. 5237-46.
73. Angelberger, S., et al., *Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation*. 2013. **108**(10): p. 1620-1630.
74. Moayyedi, P., et al., *Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial*. 2015. **149**(1): p. 102-109. e6.
75. Paramsothy, S., et al., *Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial*. 2017. **389**(10075): p. 1218-1228.
76. Costello, S.P., et al., *Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2019. **321**(2): p. 156-164.
77. Allegretti, J.R., et al., *The 5D framework: a clinical primer for fecal microbiota transplantation to treat Clostridium difficile infection*. Gastrointestinal Endoscopy, 2018. **87**(1): p. 18-29.
78. Hirsch, B.E., et al., *Effectiveness of fecal-derived microbiota transfer using orally administered capsules for recurrent Clostridium difficile infection*. BMC Infectious Diseases, 2015. **15**(1): p. 191.
79. Ramai, D., et al., *Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness*. Ann Gastroenterol, 2019. **32**(1): p. 30-38.
80. Fang, H., L. Fu, and J. Wang, *Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. BioMed Research International, 2018. **2018**: p. 8941340.
81. Sood, A., et al., *Efficacy of fecal microbiota therapy in steroid dependent ulcerative colitis: a real world intention-to-treat analysis*. Intest Res, 2019. **17**(1): p. 78-86.
82. Kim, K.O. and M. Gluck, *Fecal Microbiota Transplantation: An Update on Clinical Practice*. ce, 2019. **52**(2): p. 137-143.

83. Cold, F., et al., *Systematic review with meta-analysis: encapsulated faecal microbiota transplantation – evidence for clinical efficacy*. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2021. **14**: p. 17562848211041004.
84. Adler, E., et al., *Capsule-Delivered Fecal Microbiota Transplant Is Safe and Well Tolerated in Patients with Ulcerative Colitis*. *Dig Dis Sci*, 2019. **64**(9): p. 2452-2454.
85. Cold, F., et al., *Multidonor FMT capsules improve symptoms and decrease fecal calprotectin in ulcerative colitis patients while treated - an open-label pilot study*. *Scand J Gastroenterol*, 2019. **54**(3): p. 289-296.
86. Steube, A., et al., *Long-term Multidonor Faecal Microbiota Transfer by Oral Capsules for Active Ulcerative Colitis*. *J Crohns Colitis*, 2019. **13**(11): p. 1480-1481.
87. Cammarota, G., et al., *International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice*. *Gut*, 2019. **68**(12): p. 2111-2121.
88. Youngster, I., et al., *Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing Clostridium difficile infection*. 2014. **312**(17): p. 1772-1778.
89. Jiang, Z.-D., et al., *Safety and preliminary efficacy of orally administered lyophilized fecal microbiota product compared with frozen product given by enema for recurrent Clostridium difficile infection: A randomized clinical trial*. *PLOS ONE*, 2018. **13**(11): p. e0205064.
90. Kao, D., et al., *Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2017. **318**(20): p. 1985-1993.
91. Serrano-Villar, S., et al., *Fecal microbiota transplantation in HIV: A pilot placebo-controlled study*. *Nature Communications*, 2021. **12**(1): p. 1139.
92. Kassam, Z., et al., *Microbial Emulsion Matrices: A Novel Method to Produce Stable, Orally Available Capsules for Fecal Microbiota Transplantation to Treat Clostridium difficile: 1299*. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 2015. **110**.
93. Halaweish, H.F., S. Boatman, and C. Staley, *Encapsulated Fecal Microbiota Transplantation: Development, Efficacy, and Clinical Application*. 2022. **12**.

94. Varga, A., et al., *How to Apply FMT More Effectively, Conveniently and Flexible—A Comparison of FMT Methods*. 2021. **11**: p. 657320.
95. Allegretti, J.R., et al., *Fecal microbiota transplantation capsules with targeted colonic versus gastric delivery in recurrent Clostridium difficile infection: a comparative cohort analysis of high and lose dose*. 2019. **64**(6): p. 1672-1678.
96. Gweon, T.-G., et al., *Clinical Practice Guidelines for Fecal Microbiota Transplantation in Korea*. Journal of Neurogastroenterology and Motility, 2022. **28**(1): p. 28-42.
97. He, J., et al., *A comprehensive approach to stool donor screening for faecal microbiota transplantation in China*. Microbial Cell Factories, 2021. **20**(1): p. 216.
98. Bibbò, S., et al., *Fecal Microbiota Transplantation: Screening and Selection to Choose the Optimal Donor*. J Clin Med, 2020. **9**(6).
99. Odamaki, T., et al., *Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study*. BMC Microbiol, 2016. **16**: p. 90.
100. Woodworth, M.H., et al., *Challenges in fecal donor selection and screening for fecal microbiota transplantation: A review*. Gut microbes, 2017. **8**(3): p. 225-237.
101. Terveer, E.M., et al., *How to: Establish and run a stool bank*. Clinical Microbiology and Infection, 2017. **23**(12): p. 924-930.
102. Vijay, A. and A.M. Valdes, *Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review*. European Journal of Clinical Nutrition, 2022. **76**(4): p. 489-501.
103. Davis, C.D., *The Gut Microbiome and Its Role in Obesity*. Nutr Today, 2016. **51**(4): p. 167-174.
104. Prevention, C.f.D.C.a., *About Adult BMI*. 2022.
105. Alang, N. and C.R. Kelly, *Weight Gain After Fecal Microbiota Transplantation*. Open Forum Infectious Diseases, 2015. **2**(1): p. ofv004.
106. Gong, J., et al., *Gut Microbiota Characteristics of People with Obesity by Meta-Analysis of Existing Datasets*. Nutrients, 2022. **14**(14).

107. John, G.K. and G.E. Mullin, *The Gut Microbiome and Obesity*. Curr Oncol Rep, 2016. **18**(7): p. 45.
108. Ley, R.E., *Obesity and the human microbiome*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(1): p. 5-11.
109. Weersma, R.K., A. Zhernakova, and J. Fu, *Interaction between drugs and the gut microbiome*. Gut, 2020. **69**(8): p. 1510.
110. Vasilakopoulou, A., et al., *Gastrointestinal Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococci and Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria in an Endemic Setting: Prevalence, Risk Factors, and Outcomes*. Front Public Health, 2020. **8**: p. 55.
111. Shenoy, E.S., et al., *Natural history of colonization with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin-resistant Enterococcus (VRE): a systematic review*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 177.
112. (FDA), F.a.D.A., *Important Safety Alert Regarding Use of Fecal Microbiota for Transplantation and Risk of Serious Adverse Reactions Due to Transmission of Multi-Drug Resistant Organisms*. 2019.
113. Ianiro, G., et al., *Screening of faecal microbiota transplant donors during the COVID-19 outbreak: suggestions for urgent updates from an international expert panel*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**(5): p. 430-432.
114. Di Pilato, V., et al., *Validation of Two Commercial Multiplex Real-Time PCR Assays for Detection of SARS-CoV-2 in Stool Donors for Fecal Microbiota Transplantation*. Microorganisms, 2022. **10**(2).
115. Chen, J., et al., *Stool Banking for Fecal Microbiota Transplantation: Methods and Operations at a Large Stool Bank*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021. **11**.
116. Panchal, P., et al., *Scaling Safe Access to Fecal Microbiota Transplantation: Past, Present, and Future*. Curr Gastroenterol Rep, 2018. **20**(4): p. 14.
117. Burns, L.J., et al., *499 donor recruitment and eligibility for fecal microbiota transplantation: results from an international public stool bank*. 2015. **148**(4): p. S-96-S-97.

118. Gupta, A., S.J.I. Khanna, and d. resistance, *Community-acquired Clostridium difficile infection: an increasing public health threat*. 2014. **7**: p. 63.
119. Paramsothy, S., et al., *Donor Recruitment for Fecal Microbiota Transplantation*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2015. **21**(7): p. 1600-1606.
120. Dubois, N.E., et al., *Challenges of Screening Prospective Stool Donors for Fecal Microbiota Transplantation*. *Biological Research For Nursing*, 2020. **23**(1): p. 21-30.
121. Kassam, Z., et al., *Donor Screening for Fecal Microbiota Transplantation*. *N Engl J Med*, 2019. **381**(21): p. 2070-2072.
122. Petrof, E.O. and A.J.G. Khoruts, *From stool transplants to next-generation microbiota therapeutics*. 2014. **146**(6): p. 1573-1582.
123. Blake, M.R., J.M. Raker, and K. Whelan, *Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016. **44**(7): p. 693-703.
124. Andersson, A.F., et al., *Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing*. *PLOS ONE*, 2008. **3**(7): p. e2836.
125. Taylor, D.L., et al., *Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016. **82**(24): p. 7217-7226.
126. Torrent, I., *Ion PGM Hi-Q TM View OT2 Kit*. 2017.
127. Torrent, I., *Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit*. 2017.
128. Gonzalez, A., et al., *Qiita: rapid, web-enabled microbiome meta-analysis*. *Nat Methods*, 2018. **15**(10): p. 796-798.
129. Quast, C., et al., *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. *Nucleic Acids Research*, 2013. **41**(D1): p. D590-D596.
130. Nilsson, R.H., et al., *The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications*. *Nucleic Acids Research*, 2019. **47**(D1): p. D259-D264.

131. Genomics, B.E. *Calculate and draw custom Venn diagrams*. Available from: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>
132. Botucatu, A.I.U. *Pesquisa da Unesp busca voluntários para doação de fezes*. 2019; Available from: <https://www.ibb.unesp.br/#!/noticia/35/pesquisa-da-unesp-busca-voluntarios-para-doacao-de-fezes>.
133. Marília, G.B.e. *Unesp busca doadores de fezes ‘especiais’ para pesquisar novo tratamento contra colite*. 2019; Available from: <https://g1.globo.com/sp/bauru-marilia/noticia/2019/07/13/unesp-busca-doadores-de-fezes-especiais-para-pesquisar-novo-tratamento-contr-colite.ghtml>.
134. Santos, A.C.d.S., *Microbioma Intestinal De Portadores De Retocolite Ulcerativa E Doença De Crohn Atendidos No Hospital Das Clínicas Da Unesp De Botucatu*. 2020. p. 101.
135. Novak, J. and J.A. Katz, *Probiotics and prebiotics for gastrointestinal infections*. Current Infectious Disease Reports, 2006. **8**(2): p. 103-109.
136. Terpou, A., et al., *Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value*. Nutrients, 2019. **11**(7).
137. Wang, G., et al., *Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**(20): p. 3917-3937.
138. Yang, H., et al., *Ulcerative Colitis-associated E. coli pathobionts potentiate colitis in susceptible hosts*. Gut Microbes, 2020. **12**(1): p. 1847976.
139. Tecer, D., et al., *Succinivibrionaceae is dominant family in fecal microbiota of Behçet's Syndrome patients with uveitis*. PLoS One, 2020. **15**(10): p. e0241691.
140. Mancabelli, L., et al., *Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis*. FEMS Microbiology Ecology, 2017. **93**(12): p. fix153.