

Inês Duarte Almeida Cêrca



Transplante de Microbiota Fecal

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Inês Duarte Almeida Cêrca



Transplante de Microbiota Fecal

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Inês Duarte Almeida Cêrca

Transplante de Microbiota Fecal

A aluna:

Inês Duarte Almeida Cêrca

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

O Transplante de Microbiota Fecal consiste na transferência de material fecal de um dador saudável para um recetor doente com o objetivo de restaurar uma microflora intestinal disbiótica, provocada pelo uso de antibióticos ou outras perturbações do microbioma. A principal indicação para a utilização do Transplante de Microbiota Fecal é a infeção recorrente por *Clostridium difficile* e foi demonstrada uma elevada eficácia na erradicação desta infeção e dos sintomas a ela associados. Existem outras patologias, gastrointestinais ou não, passíveis de serem tratadas através do Transplante de Microbiota Fecal. Contudo, é necessário comprovar o seu potencial terapêutico e realizar estudos aprofundados para confirmar a utilização deste método no tratamento dessas doenças. O Transplante de Microbiota Fecal pode ser administrado através do trato gastrointestinal superior (sonda nasogástrica, nasoduodenal, esofagogastroduodenoscopia ou cápsulas orais) ou do trato gastrointestinal inferior (colonoscopia, sigmoidoscopia ou enema de retenção). No entanto, deve-se ter em conta os riscos e benefícios de cada via de administração, bem como, e não menos importante, o estado de saúde do doente. Não existe ainda um consenso no que diz respeito à regulamentação legislativa do Transplante de Microbiota Fecal. No entanto, consideram-se duas possibilidades para o classificar: como um medicamento biológico ou como um tecido humano. Esta última incentiva e promove a pesquisa e garante a segurança do procedimento, uma vez que é exigida a todos os tecidos humanos destinados a serem transplantados a triagem completa das amostras e o controlo dos registos. Porém, a *Food and Drug Administration* considera o Transplante de Microbiota Fecal um produto biológico e classificou-o como um medicamento experimental.

Palavras-chave: Transplante de Microbiota Fecal, microbioma intestinal, microbiota intestinal, *Clostridium difficile*, bacterioterapia, transplante fecal, Diretrizes para infeções por *Clostridium difficile*, Doença Inflamatória Intestinal, vias de administração do Transplante de Microbiota Fecal, formas farmacêuticas do Transplante de Microbiota Fecal.

Abstract

Fecal Microbiota Transplantation consists of transferring fecal material from a healthy donor to a diseased recipient with the aim of restoring a dysbiotic intestinal microflora caused by the use of antibiotics or other disorders of the microbiome. The main indication for the use of Fecal Microbiota Transplantation is recurrent *Clostridium difficile* infection and a high efficacy has been demonstrated in the eradication of this infection and the associated symptoms. There are other pathologies, gastrointestinal or otherwise, that can be treated through Fecal Microbiota Transplantation. However, it is necessary to prove its therapeutic potential and carry out in-depth studies to confirm the use of this method in the treatment of these diseases. Fecal Microbiota Transplantation can be administered through the upper gastrointestinal tract (nasogastric tube, nasoduodenal, esophagogastroduodenoscopy or oral capsule) or lower gastrointestinal tract (colonoscopy, sigmoidoscopy or retention enema). However, should be taken in consideration the risks and benefits of each route of administration as well as, nonetheless, the patient's state of health. There is still no consensus regarding the legislative regulation of Fecal Microbiota Transplantation, and there are two possibilities for classification: as a biological drug or as a human tissue. The latter encourages and promotes research and ensures the safety of the procedure, since all human tissues intended for transplantation are required for complete screening of samples as well as control of the records. Nonetheless, the Food and Drug Administration considers Fecal Microbiota Transplantation to be a biological product and has classified it as an experimental drug.

Key-words: Fecal Microbiota Transplantation, gut microbiome, gut microbiota, *Clostridium difficile*, bacteriotherapy, fecal transplant, Guidelines for *Clostridium difficile* infections, Inflammatory Bowel Disease, administration routes of Fecal Microbiota Transplantation, pharmaceutical forms of Fecal Microbiota Transplantation.

Metodologia

Esta monografia assenta numa revisão bibliográfica sobre o Transplante de Microbiota Fecal e as doenças que podem ser tratadas através dele, bem como sobre as formas farmacêuticas pelas quais pode ser administrado, não contendo qualquer tipo de trabalho prático experimental.

O método utilizado na realização deste trabalho passou pela pesquisa de artigos científicos e outras publicações, desde outubro de 2017 a outubro de 2018, em bases de dados científicas como o PubMed, o Springer e o Science Direct e motores de busca como, por exemplo, o Google Académico. Os artigos utilizados até à data remontam a 1996 até 2018.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Pedro Miguel Barata da Silva Coelho, meu orientador na realização desta dissertação, pela ajuda e disponibilidade que me proporcionou.

À Ana Margarida Fonseca de Castro Gonçalves, pela incansável ajuda que me deu nas formatações necessárias, um muito obrigada!

Aos meus amigos, André Pinto, Ana Cecília Silva, Ana Freitas e Cátia Ferreira, pelo incentivo e apoio que sempre me deram, sem me deixar desanimar.

Aos meus pais, por tornarem tudo isto possível! Obrigada pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim.

Dedicatória

Para a minha Irmã Liliana que trago todos os dias no coração e que, esteja onde estiver, me ajuda a nunca desistir!

Índice

Resumo	i
Abstract.....	ii
Metodologia.....	iii
Agradecimentos	iv
Dedicatória.....	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Introdução.....	1
I. O Transplante de Microbiota Fecal.....	6
II. Patologias possíveis de tratar pelo Transplante de Microbiota Fecal.....	8
II.1. Infecção recorrente por <i>Clostridium difficile</i>	8
II.2. Doença Inflamatória Intestinal	16
II.3. Obesidade	19
II.4. Distúrbios neurológicos.....	20
II.5. Perturbações do Espectro do Autismo	21
III. Critérios para a realização do Transplante de Microbiota Fecal	24
III.1. Seleção do dador	24
III.2. Preparação do recetor	29
III.3. Procedimento para a preparação de fezes	29

Transplante de Microbiota Fecal

III.4. Limitações do Transplante de Microbiota Fecal	31
IV. Aspectos Regulamentares.....	34
V. Formas farmacêuticas para o Transplante de Microbiota Fecal	37
V.1. Enema de retenção	37
V.2. Formas líquidas para sonda nasogástrica e nasoduodenal	37
V.3. Formas líquidas para colonoscopia.....	39
V.4. Cápsula oral	41
V.5. Formas Comerciais	42
Conclusão	46
Bibliografia.....	48

Índice de Figuras

Figura 1: Genes responsáveis pela transcrição das toxinas A e B de *C. difficile*. Adaptado de Kelly e LaMont (2008). 8

Figura 2: Taxas de cura para infecção recorrente por *C.difficile* num estudo randomizado. Adaptado de van Nood et al. (2013). 11

Figura 3: Resultados do Transplante de Microbiota Fecal *versus* antibioterapia com metronidazol na infecção primária por *C. difficile*. Adaptado de Juul et al. (2018). 15

Figura 4: Interações do eixo microbioma-intestino-cérebro em doentes com PEA. Adaptado de Luna et al. (2016). 22

Índice de Tabelas

Tabela 1: Questionário de pré-seleção. Adaptado de Andremont et al. (2014), Bakken et al. (2011), Batista et al. (2015) e Paramsothy et al. (2015). 25

Tabela 2: Questionário de seleção e eventos ocorridos desde a pré-seleção. Adaptado de Andremont et al. (2014). 28

Tabela 3: Vantagens e desvantagens das formas farmacêuticas para administração do Transplante de Microbiota Fecal. Adaptado de Brandt (2013); Cammarota et al. (2017); Choi e Cho (2016); Kassam et al. (2012); Lagier e Raoult (2016); Vindigni et al. (2013); Youngster et al. (2016). 44

Tabela 4: Vantagens e desvantagens das formas farmacêuticas para administração do Transplante de Microbiota Fecal (continuação). Adaptado de Brandt (2013); Cammarota et al. (2017); Choi e Cho (2016); Kassam et al. (2012); Lagier e Raoult (2016); Vindigni et al. (2013); Youngster et al. (2016). 45

Lista de Abreviaturas

AABB – Associação Americana de Bancos de Sangue (do inglês *American Association of Blood Banks*)

ACHIM – Microbiota Intestinal Humana Cultivada em Meio Anaeróbio (do inglês *Anaerobically Cultivated Human Intestinal Microbiota*)

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AINEs – Anti-Inflamatórios Não Esteroides

ANSM – Agência Nacional para a Segurança dos Medicamentos e Produtos de Saúde (do francês *Agence Nationale de Sécurité du Médicament des Produits de Santé*)

Anti-HBc – Anticorpo Nuclear do Vírus da Hepatite B total

Anti-HBsAg – Anticorpo contra o Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

Anti-VCA – Anticorpos contra o Antígeno Capsular do Vírus Epstein-Barr

Anti-VHC – Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C

BHE – Barreira hematoencefálica

C. difficile – *Clostridium difficile*

DA – Doença de Alzheimer

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

DP – Doença de Parkinson

EBNA – Antígeno Nuclear do vírus Epstein-Barr

E. coli – *Escherichia coli*

EIA – Imunoensaio Enzimático (do inglês *Enzyme Immunoassay*)

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

Transplante de Microbiota Fecal

EMA – Agência Europeia de Medicamentos (do inglês *European Medicines Agency*)

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

GI – Gastrointestinal/Gastrointestinais

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

HDL – Lipoproteínas de alta densidade (do inglês *High Density Lipoproteins*)

IBP – Inibidor da Bomba de Prótons

ICD – Infecção por *Clostridium difficile*

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IMC – Índice de Massa Corporal

INF- γ – Interferão gama

LPS – Lipopolissacarídeo

NaCl – Cloreto de sódio

NMI – Novo Medicamento Investigacional

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEA – Perturbações do Espectro do Autismo

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

Transplante de Microbiota Fecal

RPR-test – Teste rápido da Reagina Plasmática (do inglês *Rapid Plasma Reagin test*)

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossômico (do inglês *ribosomal Ribonucleic Acid*)

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

TMF(s) – Transplante(s) de Microbiota Fecal

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor – Alpha*)

T. pallidum – *Treponema pallidum*

TTM – Terapia de Transferência de Microbiota

VHA – Vírus da Hepatite A

VHB – Vírus da Hepatite B

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Introdução

A microbiota humana refere-se ao conjunto de microrganismos que coexistem e se desenvolvem, de forma simbiótica, nas diversas superfícies do organismo humano, ou seja, na pele e mucosas, e representa o elemento chave para a homeostasia do organismo. De todas as partes do corpo humano, sabe-se que o trato gastrointestinal (GI) é o principal reservatório de microrganismos. Assim, a microbiota intestinal humana é considerada como um dos ecossistemas mais completos à face da terra, composta por aproximadamente 10^{14} bactérias, vírus, fungos, parasitas e arqueas que no total atingem uma biomassa de cerca de 1 Kg. Ao genoma coletivo destes microrganismos dá-se o nome de microbioma, o qual conta com mais de três milhões de genes (Borody e Campbell, 2012; Garcia-Garcia-de-Paredes *et al.*, 2015).

O número de células microbianas no organismo humano é aproximadamente 10 vezes superior ao número de células somáticas humanas e, simultaneamente, o microbioma supera em 100 vezes o genoma humano (Borody e Campbell, 2012). A diversidade da microbiota intestinal abrange quatro principais filos: Bacteroidetes e Firmicutes, que representam mais de 90% do microbioma intestinal e Proteobacteria e Actinobacteria, que representam os restantes 10% (Binda *et al.*, 2018).

Embora se tenha ficado a saber da enorme riqueza desta comunidade interna microbiana, a ciência não foi capaz de a estudar pormenorizadamente devido à incapacidade de cultivar muitas espécies em laboratório (Garcia-Garcia-de-Paredes *et al.*, 2015). Nos últimos 10 anos, a capacidade de investigar este notável sistema mudou drasticamente devido a uma redução dos custos no sequenciamento de nucleótidos de ácido desoxirribonucleico (DNA). Pesquisas abrangentes sobre comunidades microbianas, como o MetaHit ou o Projeto do Microbioma Humano, descreveram a composição e o perfil funcional molecular do microbioma intestinal saudável. Deste modo, o sequenciamento de nucleótidos ficou cada vez mais acessível e comum, tornando-se uma ferramenta essencial para estudar o microbioma humano. Existem várias formas de compreender o estudo da microbiota intestinal. Numa abordagem genómica, pode analisar-se o conteúdo global de DNA extraído de uma amostra de microbiota, normalmente de fezes, e compará-lo com bases de dados existentes de genes (MetaHit ou Projeto do Microbioma Humano) do RNA ribossómico dos microrganismos (em procariontes, o gene que codifica a subunidade 16S do rRNA e, em eucariontes, o gene

Transplante de Microbiota Fecal

que codifica a subunidade 18S do rRNA). É também possível analisar o RNA mensageiro produzido pela transcrição desses genes (transcriptômica) e compará-lo às bases de dados existentes de RNA ou DNA complementar. Uma última abordagem diz respeito à metabolômica, uma área de estudo científico que analisa nas amostras de microbiota os produtos finais derivados do seu metabolismo, tais como proteínas e vitaminas, através da técnica de espectroscopia de massa (Garcia-Garcia-de-Paredes *et al.*, 2015; Morgan e Huttenhower, 2014).

A microbiota intestinal apresenta várias funções importantes na imunidade e na regulação do metabolismo energético. Uma das suas principais funções é a defesa do organismo humano contra microrganismos patogênicos invasores, uma vez que a microbiota intestinal está em constante interface com o ambiente externo. Esta função é possível devido à ocorrência de competição por nutrientes e locais de adesão, de resistência à colonização e de produção de bacteriocinas e moléculas imunomoduladoras derivadas de bactérias. A microbiota intestinal é também caracterizada como uma fonte rica de probióticos protetores, uma vez que são produzidas novas bacteriocinas antimicrobianas e antipatogênicas, como é o caso da Thuricin CD. Esta bacteriocina com um estreito espectro de atividade é produzida por *Bacillus thuringiensis* e possui uma forte atividade contra a bactéria *C. difficile*. Por outro lado, existem bacteriocinas de largo espectro de atividade inibitória, como é o caso da nisina, ativas contra um amplo conjunto de bactérias Gram-positivas. Deste modo, as bactérias intestinais produtoras de bacteriocinas foram alvo de um particular interesse nos últimos anos, constatando-se que estas inibiam diretamente os agentes patogênicos no intestino (Borody e Campbell, 2012).

A microflora intestinal está também envolvida na produção de energia a partir da biotransformação de nutrientes, na regulação da absorção de cálcio, magnésio e ferro, na manutenção da função de barreira intestinal e é ainda responsável pelo desenvolvimento do sistema imunológico desde os primeiros dias de vida. Pode sofrer alterações qualitativas e quantitativas, derivadas de condições patológicas, tais como a Doença Inflamatória Intestinal (DII), a síndrome do intestino irritável, a obesidade, a diabetes *mellitus* tipo II, as doenças cardiovasculares, a psoríase e mesmo distúrbios psíquicos. A esta desregulação da homeostasia da microbiota intestinal dá-se o nome de disbiose (Binda *et al.*, 2018; Garcia-Garcia-de-Paredes *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016; Borody e Campbell, 2012).

Transplante de Microbiota Fecal

A primeira aplicação de material de fezes remonta ao século IV, à qual deram o nome de “sopa amarela”, sendo administrada oralmente para o tratamento de um doente com diarreia grave, pelo médico chinês Ge Hong (Evrensel e Ceylan, 2016). Já no século XVI, começaram a usar-se produtos derivados de fezes para distúrbios GI e até mesmo para sintomas de febre. Grupos de beduínos (árabes habitantes do deserto) consumiam as fezes dos seus camelos para tratar a disenteria bacteriana e Acquapendente, anatomista e cirurgião, estendeu posteriormente este conceito, apelidando-o de “transfaunação”, isto é, a transferência de conteúdo GI de um animal saudável para um animal doente. Desde então, este conceito tem sido bastante aplicado na área da medicina veterinária. A coprofagia consiste na prática de ingestão de fezes e é naturalmente realizada por várias espécies animais, aumentando assim a diversidade de microrganismos no seu intestino e, conseqüentemente, permitindo-lhes digerir um maior número de fontes de alimento. Estas ideias despertaram o interesse dos médicos europeus no século XVIII, nomeadamente Christian Paullini, que escreveu uma obra onde delineou o potencial terapêutico das excreções humanas (de Groot *et al.*, 2017).

Já no século XIX, o zoólogo Metchnikoff introduziu produtos fermentados na própria dieta e observou melhorias na sua saúde geral, concluindo assim que estas se deviam ao aumento do número de bactérias produzidas pelo ácido láctico – *Lactobacillus bulgaricus* – responsáveis pela proteção contra as toxinas envolvidas na aceleração do processo de senescência. Estas bactérias foram então comercializadas durante a vida de Metchnikoff, o que veio comprovar a utilização histórica dos probióticos. Seguindo a mesma ideia, o médico alemão Alfred Nissle isolou uma estirpe de *Escherichia coli*, concluindo que esta inibia o crescimento de *Shigella* e protegia da subsequente gastroenterite. Em contrapartida, constatou-se que a bactéria *E. coli* levava a condições inflamatórias crónicas (de Groot *et al.*, 2017).

Os vários exemplos de bactérias que influenciam a saúde humana e a homeostasia do organismo contribuíram para a análise mais aprofundada das suas aplicações, fazendo surgir os primeiros estudos controlados com suspensões fecais terapêuticas (de Groot *et al.*, 2017).

Com o aparecimento dos antibióticos, as doenças infecciosas deixaram de ser a causa de morte mais comum (de Groot *et al.*, 2017). No entanto, o uso disseminado destes, principalmente os de largo espetro, provoca a eliminação da microflora intestinal

Transplante de Microbiota Fecal

saudável e, conseqüentemente, a perda de resistência à colonização de bactérias como *C. difficile*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., que podem replicar-se, desta forma, em quantidades passíveis de gerar infecções oportunistas (Ghose, 2013). Na tentativa de diminuir estes efeitos colaterais na flora comensal, o bacteriologista Stanley Falkow realizou a colheita de amostras de material fecal de doentes cirúrgicos, converteu-as para a forma farmacêutica de cápsula e receitou a sua ingestão diária a metade desses doentes durante a fase de recuperação cirúrgica. O grupo tratado com cápsulas contendo matéria fecal obteve melhores resultados no tratamento, apesar de a ideia ter sido rejeitada (de Groot *et al.*, 2017).

Mais tarde, em 1958, um grupo de cirurgiões do Colorado, chefiado pelo Dr. Eiseman, com base na ideia de que o restabelecimento do equilíbrio microbiano contribui para a saúde humana, implementou o Transplante de Microbiota Fecal (TMF) pela primeira vez na medicina moderna. Trataram quatro doentes com colite pseudomembranosa e diarreia severa associada a antibioterapia através de enemas fecais de doadores saudáveis, obtendo resultados bastante favoráveis em que todos os doentes conseguiram recuperar rápida e totalmente. Aproximadamente 20 anos depois, percebeu-se que a causa da doença estava relacionada com a bactéria *C. difficile* (Evrensel e Ceylan, 2016; Borody e Khoruts, 2011). Desde então, mais de 700 doentes com infecção recorrente por *C. difficile* foram tratados com TMF (de Groot *et al.*, 2017).

Ao constatar-se a existência de semelhanças entre os estados infecciosos e não infecciosos de colite pseudomembranosa, os médicos começaram a especular sobre a possibilidade de tratar a DII e a síndrome do intestino irritável através do TMF. O mais antigo registo de tratamento de uma doença não infecciosa por TMF refere-se a um homem que sofria de colite ulcerativa refratária, o qual obteve uma recuperação completa e duradoura. Contudo, em estudos de casos posteriores, obtiveram-se várias queixas GI (de Groot *et al.*, 2017).

No começo do século XXI as aplicações do TMF foram alargadas, uma vez que novas descobertas ligavam a microbiota intestinal à fisiopatologia de doenças extraintestinais (de Groot *et al.*, 2017).

Apesar de a principal indicação para a realização de um TMF ser a infecção recorrente por *C. difficile*, começa a colocar-se a possibilidade de tratar outras patologias através deste

Transplante de Microbiota Fecal

método, como são exemplos a DII, a síndrome do intestino irritável, a obesidade, a doença eosinófila GI, a anorexia nervosa, as alergias alimentares, as doenças autoimunes, bem como doenças neurodegenerativas e de neurodesenvolvimento. No entanto, será necessário aprofundar os conhecimentos acerca destas patologias, baseados em ensaios clínicos, e assim comprovar o potencial terapêutico do TMF nestas doenças (Borody e Khoruts, 2011).

I. O Transplante de Microbiota Fecal

A bacterioterapia fecal, agora conhecida como TMF, não é uma técnica nova. A sua primeira aplicação na medicina moderna remete ao ano de 1958, como referenciado anteriormente. Este procedimento consiste em transplantar as bactérias comensais, derivadas de amostras de fezes de um indivíduo saudável para o intestino de um indivíduo doente, com o objetivo de repor a microflora intestinal e, deste modo, corrigir a disbiose subjacente, a fim de curar a doença. Esta técnica pode ser comparada a um probiótico comercial, uma vez que as próprias bactérias são introduzidas no intestino do indivíduo. A diferença está na diversidade de espécies deste probiótico natural, que varia de dador para dador (Barnes e Park, 2017).

Inicialmente é necessário realizar uma entrevista ao possível dador, em que é feito um questionário de pré-seleção para se tomar conhecimento da existência ou não do histórico familiar sobre várias doenças, bem como para fornecer algumas recomendações acerca da sua alimentação, viagens e comportamentos de risco que deve evitar, a fim de reduzir a transmissão de agentes patogénicos, infecciosos ou não. Uma semana antes da doação, realiza-se a pesquisa bacteriana em amostras de fezes do dador e, imediatamente antes da doação, o dador é submetido a um segundo questionário em que se procura por eventos ocorridos desde a pré-seleção, como por exemplo a toma de algum tipo de medicação ou episódios de diarreia. Deve-se também avaliar o aspeto macroscópico das fezes, que não podem apresentar sangue ou muco (Andremont *et al.*, 2014).

Uma vez escolhido o dador e recolhidas as amostras de fezes para a doação, é necessário transformá-las numa forma que possa ser administrada ao doente. As fezes são então diluídas em água ou numa solução de cloreto de sódio a 0,9%, homogeneizadas formando uma suspensão líquida, a qual é submetida a uma filtração, a fim de se obter uma solução livre de partículas, que é diretamente infundida no trato GI ou, posteriormente, centrifugada e colocada em cápsulas de gelatina administradas oralmente (Borody *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2015).

O TMF pode ser realizado através de diversas vias de administração, incluindo a forma de cápsulas orais. Destas fazem parte a sonda nasogástrica, a sonda nasojejunal, a esofagogastroduodenoscopia, a colonoscopia e o enema de retenção. Em termos estatísticos, a administração da solução pelo trato GI superior apresenta uma taxa de

sucesso inferior à taxa de administração por colonoscopia ou enema de retenção, uma vez que as vias nasogástrica e nasoduodenal requerem assistência radiológica para a colocação da sonda, são bastante desconfortáveis e pouco atraentes para o doente, podendo até provocar o vômito ou a aspiração. Por outro lado, o enema de retenção apresenta um baixo risco no seu procedimento, sendo que é um método barato e pouco invasivo mas podem ser necessários vários tratamentos e, por vezes, é difícil para o doente reter o material doado. Por sua vez, as vias endoscópicas têm a vantagem de poder incluir um exame da mucosa do cólon, contudo apresentam riscos no procedimento do mesmo e um aumento no custo e utilização dos serviços de saúde. Todas estas vias de administração são referidas como eficazes para o TMF, no entanto a escolha da mesma deve ter sempre em conta a situação clínica de cada doente. Para indivíduos gravemente doentes, frágeis e/ou imunocomprometidos são preferíveis os métodos menos invasivos, como é o exemplo do enema de retenção (Barnes e Park, 2017; Gupta *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2015).

A bactéria *C. difficile* apresenta uma relação de simbiose com o organismo humano, tornando-se oportunista e, desta forma, tem a capacidade de provocar infeção no intestino quando o equilíbrio normal da flora comensal é perturbado, por exemplo, pelo uso de antibióticos (de Groot *et al.*, 2017).

Segundo as diretrizes para o tratamento de infeções por *C. difficile*, a partir da terceira recidiva deve ser considerado o TMF (Surawicz *et al.*, 2013). Para uma ICD moderada, que não responde a antibioterapia com vancomicina ou fidaxomicina (terapia padrão) durante uma semana, e para uma ICD severa ou mesmo fulminante, que não responde à terapia padrão num prazo de 48 horas, é necessário recorrer ao TMF (Gupta *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2015).

II. Patologias possíveis de tratar pelo Transplante de Microbiota Fecal

II.1. Infecção recorrente por *Clostridium difficile*

A bactéria *C. difficile* é classificada como Gram-positiva, anaeróbica obrigatória, com a forma de bacilos, produtora de esporos e de duas toxinas, toxina A e toxina B, as quais provocam dano na mucosa intestinal, estando assim envolvidas na patogênese da bactéria e, por isso, são consideradas como o seu principal fator de virulência (Gupta *et al.*, 2016; Lofland *et al.*, 2013). Estas toxinas ligam-se a recetores das células epiteliais do intestino, internalizam-se e, posteriormente, catalisam a glicosilação de proteínas designadas por Rho-GTPases. Esta reação provoca a desagregação dos filamentos de actina do citoesqueleto, levando à morte celular e, por conseguinte, à formação de pseudomembranas (Ghose, 2013; Kelly e LaMont, 2008; Levinson, 2016).

As toxinas A e B são transcritas de um locus de patogenicidade que inclui cinco genes: *tcdA* e *tcdB* são os genes das toxinas A e B, respetivamente; os restantes três genes são reguladores, nomeadamente *tcdR*, *tcdC* e *tcdE*. O gene *tcdC* codifica um suposto regulador negativo da transcrição das toxinas. Concomitantemente, o gene *tcdR* regula positivamente a transcrição das toxinas. Quanto à função da proteína derivada do gene *tcdE*, esta ainda não é clara, mas pensa-se que poderá facilitar a libertação de toxinas pela lise da membrana citoplasmática das bactérias (Figura 1) (Kelly e LaMont, 2008).

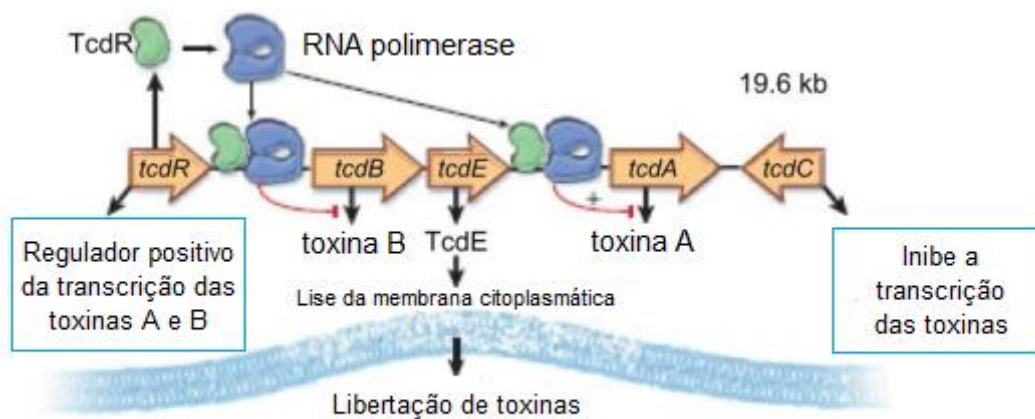


Figura 1: Genes responsáveis pela transcrição das toxinas A e B de *C. difficile*. Adaptado de Kelly e LaMont (2008).

Através de amostras obtidas de doentes durante epidemias recentes, percebeu-se que a estirpe NAP – 1/027 de *C. difficile* apresenta mutações de deleção no gene *tcdC*. Deste modo, a proteína inibidora da produção de toxinas não se forma e, conseqüentemente, há

Transplante de Microbiota Fecal

um aumento da produção das toxinas A e B. Para além disso, esta estirpe apresenta resistência às fluoroquinolonas e produz uma terceira toxina, designada de toxina binária que, apesar de não estar clara a sua função na patogénese da infeção por *C. difficile*, especula-se que atue sinergicamente com as toxinas A e B, provocando colite pseudomembranosa grave (Kelly e LaMont, 2008). Está documentado um surto na cidade de Quebec, no Canadá, pela estirpe de *C. difficile* hipervirulenta NAP – 1/027, no ano de 2000, com uma taxa de mortalidade de 16,7% (Ghose, 2013).

O uso de antibióticos como a clindamicina, as cefalosporinas, as penicilinas e, mais recentemente, as fluoroquinolonas, está relacionado com a patogénese da bactéria *C. difficile*, uma vez que estes provocam uma disbiose na microflora intestinal, permitindo à bactéria a sua colonização e, conseqüentemente, o aparecimento de infeção (Ghose, 2013; Gupta *et al.*, 2016). Existem também dois grupos de fármacos, os inibidores da bomba de prótons e os antagonistas dos recetores H2 que, ao diminuírem a acidez do estômago, permitem aos esporos a sua transição até ao intestino e a posterior germinação para o estado vegetativo produtor de toxinas (Ghose, 2013).

Para além do uso de antibióticos aos quais a *C. difficile* apresenta resistência, a idade avançada (mais de 65 anos) e as comorbidades aumentam o risco de ICD. A hospitalização de doentes ou a sua permanência em lares ou unidades de cuidados continuados são outros fatores de risco importantes, uma vez que a bactéria coloniza até 50% dos doentes no espaço de 4 semanas. Existem ainda outros grupos que apresentam elevado risco de contrair ICD: doentes oncológicos ou que realizem quimioterapia, doentes imunocomprometidos, transplantados ou com desordens a nível intestinal (Doença de Crohn, DII). Os esporos de *C. difficile* são transmitidos via fecal / oral e são bastante resistentes aos descontaminantes utilizados, às altas temperaturas, a antibióticos de largo espectro e a condições de colonização adversas, como por exemplo, o baixo pH gástrico (Ghose, 2013; Lofland *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2018).

Uma vez instalada a infeção, esta apresenta sintomas que vão desde uma ligeira diarreia até à condição de colite pseudomembranosa, que pode ser fatal (Lofland *et al.*, 2013). No entanto, estudos epidemiológicos demonstram que existe uma taxa de 3% de indivíduos saudáveis que podem ser infetados pela *C. difficile* com ausência de sintomas (Ghose, 2013). A ICD está a tornar-se numa epidemia cada vez mais virulenta e grave. Anualmente são relatados aproximadamente 500 000 casos de ICD só nos Estados Unidos

da América (EUA) com custos associados de 3 bilhões de dólares (Gupta *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2018).

O tratamento da ICD passa por suspender a toma do antibiótico que desencadeou a infecção e começar a antibioterapia com metronidazol ou vancomicina. No entanto, a taxa de recorrência após a terapia padrão é de 20,2% e 18,4%, respectivamente. Para doentes com infecção recorrente por *C. difficile*, é recomendado o tratamento com fidaxomicina, um antibiótico com uma taxa de cura semelhante à vancomicina, no entanto, com um espectro de atividade antimicrobiana mais estreito, sendo mais específico para *C. difficile* quando comparado à vancomicina (Gupta *et al.*, 2016).

Apesar do procedimento do TMF incluir uma rigorosa triagem de potenciais dadores fecais, estes são, normalmente, familiares do doente, uma vez que a diversidade microbiota poderá ser idêntica (Ghose, 2013).

Já existem estudos que comprovam a eficácia e o sucesso do TMF para a ICD, mas os mecanismos pelos quais a bacterioterapia fecal atua ainda não estão completamente esclarecidos. Restabelecer as comunidades de Bacteroidetes e Firmicutes, bem como diminuir as de Proteobacteria, é um importante evento no sucesso do TMF. Outro fator relaciona-se com o metabolismo dos ácidos biliares. Alguns grupos de microrganismos da microflora comensal têm como função converter ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários. Na medida em que os ácidos biliares primários estimulam a germinação dos esporos de *C. difficile* e os secundários inibem a sua germinação, as amostras de fezes pré-TMF de indivíduos com infecção recorrente por *C. difficile* terão um nível de ácidos biliares secundários muito baixos. Este acontecimento é revertido após o TMF e as amostras de fezes assemelham-se às de indivíduos saudáveis (Gupta *et al.*, 2016; Weingarden *et al.*, 2014).

Outro mecanismo recentemente descrito envolve o metabolismo do ácido siálico. Este constitui uma importante fonte de energia para a bactéria *C. difficile*, bem como para várias bactérias comensais (Gupta *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2013). Quando os antibióticos provocam uma disbiose na microflora intestinal dá-se um aumento de ácido siálico nas mucosas do intestino. Deste modo, a bactéria *C. difficile* consome o ácido siálico e propaga-se mais rapidamente. O TMF desempenha o seu efeito terapêutico repondo a homeostasia da microflora comensal, aumentando o consumo do ácido siálico pelas

Transplante de Microbiota Fecal

bactérias comensais e, conseqüentemente, priva a *C. difficile* de uma fonte de energia essencial. Para além destes, outros mecanismos continuam a ser pesquisados e estudados para demonstrar a eficácia do TMF no tratamento da infecção recorrente por *C. difficile* (Gupta *et al.*, 2016). Um exemplo desses novos mecanismos diz respeito a uma bacteriocina recentemente descoberta, produzida por bactérias comensais do intestino humano, que possui uma atividade específica contra *C. difficile*, a Thuricin CD (Petrosillo *et al.*, 2018).

Um recente estudo randomizado, realizado em Amesterdão, comparou três grupos de doentes com infecção recorrente por *C. difficile* que receberam diferentes tratamentos. Um grupo de 16 doentes recebeu o tratamento com vancomicina, seguido de lavagem gástrica e, no dia seguinte, uma infusão de suspensão de fezes de um dador através de uma sonda nasoduodenal; os grupos controlo, cada um com 13 doentes, receberam tratamento com vancomicina, com ou sem lavagem gástrica. Após a primeira infusão da suspensão de fezes, 13 dos 16 doentes obtiveram resolução da ICD. Os três restantes doentes receberam uma segunda infusão de suspensão de fezes de um dador diferente, com resolução da infecção em dois doentes.

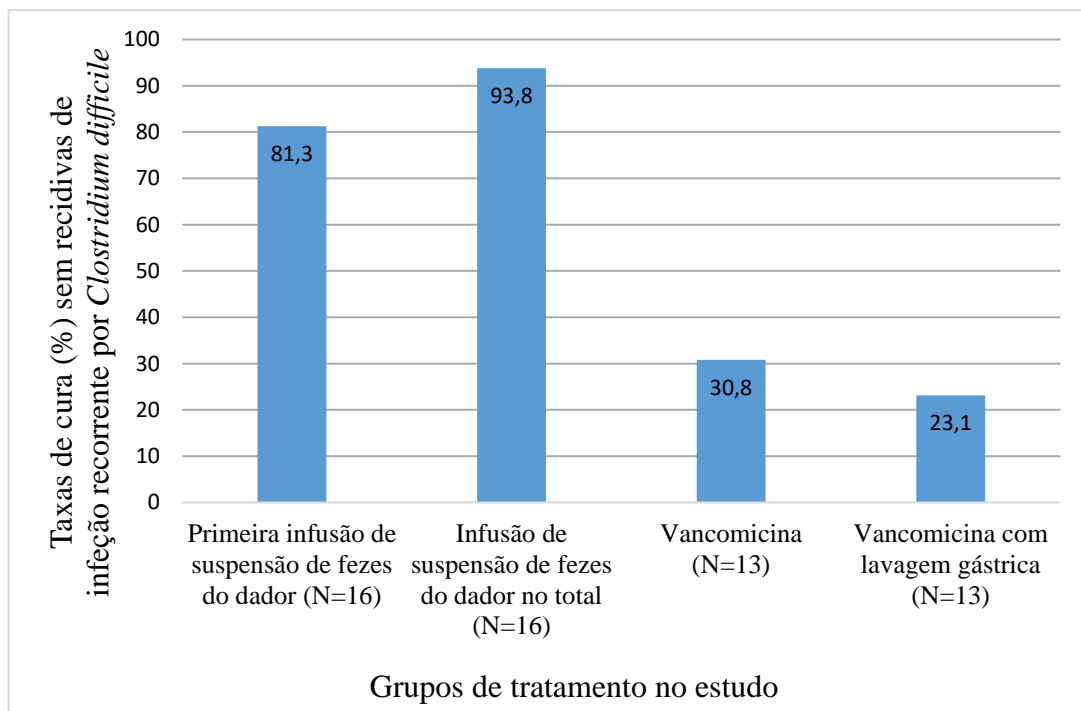


Figura 2: Taxas de cura para infecção recorrente por *C. difficile* num estudo randomizado. Adaptado de van Nood *et al.* (2013).

Transplante de Microbiota Fecal

Na Figura 2 pode observar-se que, no total, 15 dos 16 doentes (93,8%) obtiveram resolução da infeção recorrente por *C. difficile*. Nos grupos controlo, o que recebeu apenas vancomicina obteve resolução da infeção para 4 dos 13 doentes (30,8%) e o grupo que recebeu vancomicina seguida de lavagem gástrica obteve resolução para 3 dos 13 doentes (23,1%). Assim, conclui-se que a infusão de fezes de um dador é consideravelmente mais eficaz para o tratamento da infeção recorrente por *C. difficile* do que as terapias padrão de antibióticos, neste caso específico, da vancomicina (van Nood *et al.*, 2013).

Segundo o protocolo de um estudo de Juul *et al.* (2018), o único atualmente aceite para avaliar o uso do TMF na infeção primária por *C. difficile*, cultivava-se continuamente uma microbiota fecal humana de um dador saudável há mais de 15 anos, conseguindo sustentar uma suspensão bacteriana adequada para restaurar uma microbiota intestinal após uma ICD recorrente, tornando-a saudável. Esta suspensão constitui uma microbiota intestinal humana cultivada em meio anaeróbio (ACHIM), tem sido analisada extensivamente para agentes patogénicos e foi utilizada no presente estudo, evitando a necessidade da triagem de dadores. A sigla ACHIM substitui o termo TMF e descreve a terapia em investigação neste estudo, sendo que o seu objetivo passa por testar se a eficácia do ACHIM é maior do que a do metronidazol na indução da resolução clínica duradoura para a ICD primária (Juul *et al.*, 2018).

Em 1994, uma amostra fecal foi obtida de um indivíduo saudável com uma dieta ocidental e testada como negativa para hepatite A, B e C, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), rotavírus e calcivírus. Além disso, a amostra foi negativa para *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *C. difficile* e parasitas. Uma suspensão fecal homogeneizada foi inoculada anaerobicamente, utilizando resazurina como indicador, num meio de levedura peptonada de 30 ml que contém colesterol de gema de galinha liofilizada e, desde então, foram recultivados a cada duas semanas e armazenados a -70 ° C. Por métodos moleculares, as suspensões foram repetidamente testadas e todos os importantes grupos de microrganismos, presentes na amostra fecal original, ainda estão a ser pesquisados. Além disso, nenhum alergénio do ovo foi encontrado na suspensão fecal final. A amostra de fezes original foi congelada e armazenada a -70 ° C (Juul *et al.*, 2018).

Transplante de Microbiota Fecal

De seguida, listam-se os critérios de inclusão dos doentes que participaram no estudo de Juul *et al.* (2018):

- Doentes com idade igual ou superior a 18 anos, com ICD primária sem complicações definida como:
 - Diarreia tal como definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS): mais de 3 vezes de fezes moles ou líquidas por dia;
 - Teste de fezes positivo para toxina *C. difficile*;
 - Nenhuma evidência de ICD durante o último ano.

Seguidamente, apresentam-se os critérios de exclusão de doentes do estudo:

- Presença conhecida de outros agentes patogénicos nas fezes, conhecidos por causar diarreia;
- Gravidez e amamentação;
- Doentes com tratamento antibiótico contínuo para outras infeções, que não pode ser interrompido;
- DII;
- Doentes incapazes de fornecer consentimento informado;
- Doentes com menos de 3 meses de expectativa de vida;
- Doentes imunocomprometidos:
 - Tratamento atual ou recente com agentes antineoplásicos, nos últimos 3 meses;
 - Tratamento atual ou recente com medicação imunossupressora (como anticorpos monoclonais para células B ou T, agentes anti-TNF, antimetabólicos imunossupressores (azatioprina, 6 - mercaptopurina), inibidores de calcineurina (tacrolimus, ciclosporina), e o imunomodulador micofenolato mofetil);

Transplante de Microbiota Fecal

- Doença imunossupressora ativa.
- Doentes incapazes de cumprir os requisitos do protocolo;
- Doentes que necessitam de cuidados intensivos e que, pelo seu estado físico, são classificados na categoria IV e V pela Sociedade Americana de Anestesiologistas.

Os doentes internados nos 6 hospitais participantes do Sudeste da Noruega que apresentam uma primeira ocorrência de ICD sintomática recebem um tratamento de antibioterapia padrão durante 10 dias (metronidazol a 500mg, 4 vezes por dia) ou ACHIM, aleatoriamente. A primeira ocorrência de ICD sintomática é definida por diarreia (fezes moles ou líquidas, 3 ou mais vezes por dia) com resultado positivo para o teste da toxina de *C. difficile*, sem que existissem sinais de ICD no decorrer do último ano (Juul *et al.*, 2018).

No grupo ACHIM, 60 ml de cultura ACHIM foram infundidos através de um enema, que é posteriormente lavado com solução salina. No grupo controlo, é administrado aos doentes, durante 10 dias, metronidazol 500 mg três vezes ao dia (Juul *et al.*, 2018).

A calendarização do estudo de Juul *et al.* (2018) foi planeada da seguinte forma:

- Dia 1 (primeiro dia do tratamento): obter consentimento informado, verificar os critérios de inclusão/exclusão, histórico médico, exame físico, amostra de fezes, amostra de sangue (incluindo níveis de hemoglobina, plaquetas, leucócitos, proteína C reativa, albumina e eletrólitos);
- Dias 2 a 4: avaliar o efeito primário e considerar uma terapia adicional, se clinicamente indicado;
- Dias 4 a 10: avaliação clínica de doentes internados ou em ambulatório, ou contacto via telefone, se necessário;
- Dia 35: Entrevista para determinar se o doente foi curado sem recorrência e detetar efeitos adversos graves ocorridos;
- Dia 70: Entrevista para determinar se o doente foi curado sem recorrência e detetar efeitos adversos graves ocorridos (parâmetro primário).

Transplante de Microbiota Fecal

O parâmetro primário a ser avaliado foi a proporção de doentes curados da ICD definidos por resolução da diarreia e sem recorrências nos 70 dias após o início da terapia. Como parâmetros secundários, avaliaram-se: o tempo em dias para a resolução clínica dos sintomas definida por ausência de diarreia; e os efeitos adversos ocorridos (Juul *et al.*, 2018).

A resposta ao tratamento avaliou-se através de uma entrevista aos doentes por assessores independentes, e todos os doentes foram solicitados a registrar todos os movimentos intestinais diários durante a primeira semana. Se no dia 4 a situação clínica se mantém sem alterações desde a administração da ACHIM, a ser determinada pelo médico do doente, deverá ser considerada uma segunda instilação de ACHIM ou iniciar-se antibioterapia. Em caso de agravamento dos sintomas da doença a qualquer momento durante o seguimento do doente, o médico deve prescrever um tratamento apropriado (Juul *et al.*, 2018).

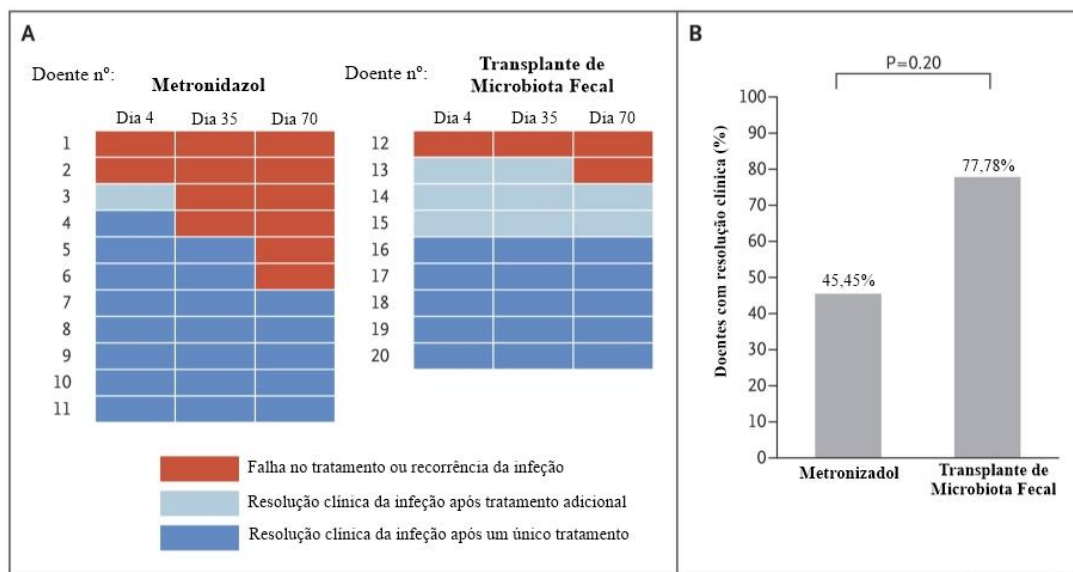


Figura 3: Resultados do Transplante de Microbiota Fecal *versus* antibioterapia com metronidazol na infeção primária por *C. difficile*. Adaptado de Juul *et al.* (2018).

Segundo a imagem acima (Figura 3), dos 9 doentes tratados com TMF, 5 obtiveram sucesso no tratamento primário (doentes 16 a 20). Dos 4 que não alcançaram resolução clínica no tratamento primário ou que apresentavam parcialmente melhorias, 2 doentes obtiveram sucesso no tratamento adicional após antibioterapia com metronidazol oral a 400 mg, 3 vezes ao dia, durante 10 dias (doente 14 e 15). O doente 14 já demonstrava melhorias clínicas e bioquímicas antes da introdução da antibioterapia no dia 4, a pedido do doente. O doente 15, como apresentava diarreia persistente após o tratamento com

TMF, foi-lhe administrado metronidazol no dia 3, embora os sintomas de diarreia não tivessem sido descritos como fortes pelo doente. Durante os 70 dias de acompanhamento, nenhum desses doentes apresentou recidiva de ICD. Os doentes 12 e 13 foram referidos com falha do tratamento no seguimento do dia 70: o doente 12 teve alguma melhoria clínica, no entanto tinha diarreia persistente (8 evacuações diárias) no dia 4. No dia 8 a diarreia aumentou, segundo a avaliação do médico, e o doente iniciou o tratamento com metronidazol a 400 mg por via oral, 3 vezes ao dia, durante 10 dias. Após este tratamento inicial, houve resolução de diarreia e ausência de recorrência de ICD; quanto ao doente 13, este iniciou uma antibioterapia igual à do doente 12 como tratamento adicional, devido à falha na resolução clínica da infeção com o TMF, conseguindo desta forma, a cura dos sintomas. No entanto, apresentou recidiva na ICD uma semana antes dos 70 dias de acompanhamento (Juul *et al.*, 2018).

Do grupo dos 11 doentes tratados com metronidazol, 5 obtiveram a cura apenas com o primeiro tratamento (doentes 7 a 11). Dos 6 restantes, 3 estavam bem inicialmente, mas apresentaram recidiva até ao dia 70 e foram assim definidos como falha do tratamento (doentes 5 e 6). O doente 4 recebeu tratamento antibiótico adicional, apresentou recidiva no dia 35 e foi assim definido como falha do tratamento. Os 2 últimos doentes (nº1 e 2) não obtiveram sucesso no tratamento primário e foram assim definidos como falhas no tratamento (Juul *et al.*, 2018).

Deste modo, pode concluir-se que foi alcançada uma taxa de cura de 45,45% para os doentes tratados com metronidazol e uma taxa de 77,78% para os doentes tratados com TMF, facto que sustenta a hipótese de que o TMF seja mais eficaz no tratamento da ICD primária do que a terapia padrão com metronidazol.

II.2. Doença Inflamatória Intestinal

A DII diz respeito a um grupo de distúrbios inflamatórios crónicos do trato GI, que engloba a Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa (Gupta *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Nos períodos ativos da doença, os doentes apresentam sintomas que se agravam numa proporção direta com a profundidade da inflamação e que dependem da localização da mesma. Entre eles, o mais comum é a diarreia, mas estão também incluídos náuseas, perda de apetite e, conseqüentemente, de peso, hemorragia retal, dor abdominal e febre (Gupta *et al.*, 2016; Kim e Cheon, 2017; Su *et al.*, 2018).

A Colite Ulcerosa é um subtipo de DII, recorrente e remitente, caracterizada por uma inflamação crónica que afeta a mucosa do reto e que se estende até ao cólon. Apesar de a causa não estar completamente esclarecida, pensa-se que, devido a uma desregulação do sistema imunitário da mucosa intestinal, seja desencadeada uma resposta imunológica exacerbada contra a microflora intestinal, causando úlceras superficiais nas diversas zonas da mucosa do intestino grosso (Cao *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2018). Já a Doença de Crohn define-se como uma inflamação crónica e idiopática, que pode ocorrer em qualquer zona do tubo digestivo, da boca até ao ânus, apesar de se apresentar mais comumente no íleo – a parte terminal do intestino delgado – e no cólon. Esta inflamação é irregular e pode afetar toda a espessura da parede intestinal, com lesões que incluem úlceras, granulomas e fissuras (Lane *et al.*, 2017; Malin *et al.*, 1996; Su *et al.*, 2018).

Embora a fisiopatologia dos subtipos da DII ainda não estar esclarecida, as causas da patogénese da DII podem ser diversas: uma disbiose da microflora intestinal provocada, por exemplo, por fatores ambientais, ou mesmo um desequilíbrio do sistema imunológico, em indivíduos com predisposição genética para a doença (Gupta *et al.*, 2016; Lane *et al.*, 2017). No que diz respeito à disbiose da microbiota intestinal, esta é caracterizada por uma redução da diversidade de espécies e observada em ambos os distúrbios da DII, com uma diminuição de membros do filo Bacteroidetes e da família *Lachnospiraceae* pertencente ao filo Firmicutes, bem como de um aumento dos membros dos filos Proteobacteria e Actinobacteria, dos géneros *Campylobacter* e *Mycobacterium* e ainda da espécie *E. coli* (Gupta *et al.*, 2016; Heath *et al.*, 2018; Kelly *et al.*, 2015; Smits *et al.*, 2013).

Constatou-se, através de biópsias de doentes com Doença de Crohn, uma diminuição global da diversidade bacteriana na microbiota intestinal, quando comparada à de indivíduos saudáveis, principalmente do filo Firmicutes. Segundo estudos, existe um decréscimo acentuado da bactéria *Faecalibacterium prausnitzii* em doentes com Doença de Crohn e um aumento significativo da mesma na fase de remissão clínica da Colite Ulcerosa. Esta bactéria comensal anti-inflamatória, através do seu metabolismo, produz butirato, um importante ácido gordo de cadeia curta, usado pelas células do epitélio intestinal como fonte energética. Este microrganismo secreta metabolitos que reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-12 (IL-12) e o interferão gama (IFN- γ) e aumenta a produção da interleucina-10 (IL-10). Assim, a utilização desta

bactéria comensal como um probiótico poderá ser benéfica para tratar a DII (Borody e Campbell, 2012; Gupta *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2008).

O tratamento de primeira linha para a Colite Ulcerosa passa pela utilização de aminossalicilatos, apesar de a sua eficácia ser limitada em doentes com Doença de Crohn. Utilizam-se também corticosteroides em situações de Colite Ulcerosa severa e em períodos ativos da Doença de Crohn moderada ou severa. Os medicamentos imunomoduladores e imunossupressores são também usados e demonstram eficácia na indução da remissão, bem como na prevenção de recidivas da DII (Su *et al.*, 2018). No entanto, é possível que estas terapias atuais, que consistem em suprimir o sistema imunológico, tenham de ser realizadas a longo prazo para evitar a recorrência da doença, o que traz custos elevados (Moayyedi, 2016).

Segundo um estudo regional realizado no sul da Finlândia, o tratamento de doentes com DII através de corticosteroides e imunossupressores aumentam o risco de infeção por *C. difficile*. No entanto, doentes com Colite Ulcerosa são mais suscetíveis de contrair esta infeção do que doentes com Doença de Crohn. Além disso, os aminossalicilatos, os antibióticos e a terapia biológica são relatados como fatores de risco para a infeção recorrente por *C. difficile* em doentes com DII (Vitikainen *et al.*, 2018). O Colégio Americano de Gastroenterologia, segundo as suas recentes diretrizes, recomenda a realização do teste para infeção por *C. difficile* para todos os doentes hospitalizados por DII. Para resultados positivos realiza-se o TMF e, após a eliminação da infeção por *C. difficile*, a gravidade da DII diminui e os doentes respondem melhor ao tratamento para a DII (Smits *et al.*, 2013).

Estas terapias com imunossupressores não garantem a cura da doença, o que faz com que se torne essencial perceber a origem da resposta imune exagerada (Moayyedi, 2016). Fatores como o tabagismo e a apendicectomia aumentam as probabilidades de adquirir a Doença de Crohn. A poluição atmosférica, bem como o uso de Anti-inflamatórios Não Esteroides (AINEs) e contraceptivos orais são também fatores associados ao aumento do risco de contrair uma DII (Su *et al.*, 2018). Porém, a teoria que prevalece é a de que existe uma disbiose da microbiota intestinal que impulsiona a desregulação imunológica e, consequentemente, provoca as lesões. É neste seguimento que se considera o TMF como uma promissora terapia para a DII. A realização de um TMF pela primeira vez num doente com Colite Ulcerosa remonta ao ano de 1989, no Reino Unido. Este doente

recebeu o TMF na forma de enema, resultando na remissão da doença, na diminuição dos sintomas e na ausência de medicação nos 6 meses posteriores (Moayyedi, 2016).

Uma recente revisão sistemática e meta-análise de 18 estudos realizados, que reuniu 122 doentes com diferentes tipos de DII submetidos à técnica de TMF, obteve uma taxa geral de remissão de 36,2%. Para os doentes com Colite Ulcerosa, que foram menos propensos a alcançar a remissão clínica, obteve-se uma taxa de remissão de 22%. Para doentes mais jovens, com idades compreendidas entre os 7 e 20 anos de idade, e para doentes com Doença de Crohn, as taxas de remissão foram mais elevadas, registando-se 64,1% e 60,5%, respetivamente. Apesar de não se ter observado nenhum efeito adverso grave após o TMF, alguns doentes referiram sentir calafrios, febre, diarreia, flatulência, vômitos e sensibilidade abdominal. É então necessária a realização de mais estudos para confirmar a eficácia e segurança do TMF no tratamento da DII. Deste modo, pode concluir-se que o TMF não é tão eficaz no tratamento da DII como é no tratamento da ICD, na qual apresenta elevadas taxas de cura, seja qual for a via de administração (Gupta *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2015).

II.3. Obesidade

Sabe-se que a obesidade é uma doença causada pela desregulação do balanço energético, quando a quantidade de energia produzida pela ingestão de alimentos ultrapassa o gasto energético corporal e caracteriza-se pela deposição excessiva de tecido adiposo (Gupta *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Existem estudos que demonstram a relevância de alterações da microbiota intestinal na fisiopatologia da obesidade e da diabetes *mellitus* tipo II, pelo aumento da permeabilidade intestinal. Foi observado um aumento na abundância de Firmicutes e um decréscimo na abundância de Bacteroidetes na microbiota fecal de ratos obesos, quando comparada à dos seus homólogos magros, bem como um aumento da capacidade de extração de energia a partir da ingestão de alimentos. No entanto, a importância da razão Firmicutes / Bacteroidetes na obesidade humana foi descrita em alguns estudos porém a sua influência ainda não foi comprovada (Li *et al.*, 2016; Smits *et al.*, 2013).

Indivíduos obesos apresentam níveis plasmáticos pós prandiais aumentados de bactérias e dos seus componentes, principalmente o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que é parte integrante da membrana externa de algumas bactérias. Este aumento deve-se,

possivelmente, ao aumento da permeabilidade intestinal provocada pela disbiose da microbiota intestinal. Os hidratos de carbono, provenientes da alimentação, são metabolizados por bactérias intestinais em ácidos gordos de cadeia curta, nomeadamente, acetato, propionato e butirato, que constituem importantes fontes de energia e que se pensa terem atividade imunomoduladora, uma vez que reduzem a permeabilidade intestinal. Após a absorção intestinal, julga-se que o transporte das endotoxinas para a veia porta hepática esteja envolvida na patogénese da inflamação de baixo grau associada à obesidade e posterior resistência à insulina em ratos (Smits *et al.*, 2013).

Um recente estudo duplo-cego, randomizado e controlado, constatou que transplantes fecais realizados de indivíduos magros para indivíduos obesos resultaram na melhoria da sensibilidade à insulina, no aumento da diversidade microbiana e ainda no aumento de bactérias produtoras de butirato, como por exemplo, *Roseburia intestinalis*, nos recetores obesos. Assim, este estudo é importante na medida em que demonstra que o TMF pode ser eficaz no tratamento da obesidade, bem como da diabetes *mellitus* tipo II (Gupta *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2015).

II.4. Distúrbios neurológicos

A microbiota intestinal, para além das funções digestivas que desempenha, está associada ao desenvolvimento e comportamento cerebral. Esta interconexão do eixo intestino - cérebro obteve um especial interesse nos últimos anos (Li *et al.*, 2016; Staley *et al.*, 2017). O intestino e o cérebro comunicam entre si através do eixo microbiota-intestino-cérebro de um modo bidirecional modulando, desta forma, a permeabilidade e motilidade intestinais, a secreção de muco e o sistema imunológico. Estímulos do Sistema Nervoso Central (SNC) podem modificar funções intestinais, bem como estímulos do intestino para o SNC podem provocar sintomas específicos (Bonaz *et al.*, 2018; Petrosillo *et al.*, 2018). As interações e comunicações altamente integradas entre o SNC, o intestino e os trilhões de microrganismos que o habitam realiza-se através do nervo vago, que representa o principal componente do sistema nervoso parassimpático e é constituído por 80% de fibras aferentes e 20% de fibras eferentes. Devido à sua função na consciência interoceptiva, o nervo vago é capaz de sentir os metabolitos da microbiota através das fibras aferentes, transportar essa informação até ao SNC, onde é integrada e, desta forma, gerar uma resposta adaptada ou inapropriada. Este último tipo de resposta pode tornar crónica uma condição patológica do trato GI ou favorecer distúrbios neurodegenerativos

(Bonaz *et al.*, 2018; Luna *et al.*, 2016). A maioria das evidências provêm de modelos animais, mas surgiu uma hipótese que liga a microbiota intestinal a vários distúrbios neurodegenerativos que incluem a Doença de Alzheimer (DA), a Doença de Parkinson (DP), a Esclerose Múltipla e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). As bactérias intestinais, através de um aumento da permeabilidade intestinal, dão origem a uma ativação do sistema imunológico provocando uma resposta inflamatória sistêmica que, conseqüentemente, prejudica a Barreira Hematoencefálica (BHE), promove a neuroinflamação e, em último caso, dá origem a lesão neural e degeneração. Acredita-se que esta via contribui para a deposição de fibrilas proteicas de β -amilóide, que são observadas em indivíduos com DA, sendo também uma característica neuropatológica da DP (Quigley, 2017).

Uma disbiose da microflora intestinal pode estar relacionada com distúrbios de neurodesenvolvimento, nomeadamente com Perturbações do Espectro do Autismo (PEA) (Hsiao *et al.*, 2013). Sabe-se que a BHE tem um papel importante no que diz respeito à troca de moléculas e nutrientes entre o cérebro e o sangue, bem como em permitir o normal funcionamento dos neurónios (Braniste *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016). Os resultados de um estudo demonstraram que a falta de uma microbiota intestinal normal em ratos *germfree* está associada ao aumento da permeabilidade da BHE. Os hidratos de carbono ingeridos na dieta servem de substrato a várias bactérias do intestino que produzem ácidos gordos de cadeia curta, principalmente acetato, butirato e propionato, os quais regulam a motilidade intestinal, mas também são absorvidos para a corrente sanguínea e transportados para vários órgãos, incluindo o cérebro. Demonstrou-se que a monocolonização de ratos adultos *germfree* com espécies como *Clostridium tyrobutyricum* (produtora de butirato) ou *Bacteroides thetaiotaomicron* (produtora de acetato e propionato), diminuiu a permeabilidade da BHE (Braniste *et al.*, 2014).

II.5. Perturbações do Espectro do Autismo

As PEA dizem respeito a um grupo de distúrbios graves de neurodesenvolvimento caracterizados por comportamentos repetitivos, dificuldades na interação social e na comunicação, sensibilidade incomum a estímulos e ainda por atividades e interesses restritos (Finegold, 2011; Hsiao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Li e Zhou, 2016; Parracho *et al.*, 2005). A incidência de PEA aumentou para 1 em cada 88 nascimentos nos EUA desde 2008 e o sexo masculino é quatro vezes mais propenso à doença do que o sexo feminino

Transplante de Microbiota Fecal

(Hsiao *et al.*, 2013; Parracho *et al.*, 2005). Apesar da etiologia da doença ainda não estar definida, pensa-se que tanto fatores genéticos como fatores ambientais estão na sua origem e são responsáveis pelo desenvolvimento de PEA. Mais de 100 genes foram envolvidos na etiologia das PEA, mas existe também uma contribuição significativa de fatores de risco ambientais que incluem bactérias intestinais, e as interações entre o intestino e o cérebro recebem assim especial atenção (Li e Zhou, 2016).

Além dos sintomas centrais, crianças com PEA apresentam comorbidades clínicas, que frequentemente incluem dificuldades alimentares, problemas GI, como diarreia, obstipação, flatulência e dor abdominal, e distúrbios do sono. Estes sintomas afetam a microflora intestinal normal, promovendo assim o crescimento excessivo de potenciais microrganismos patogénicos produtores de toxinas (Parracho *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2004). Estudos relatam que estes sintomas GI associados a uma microbiota disbiótica alteram a motilidade GI e aumentam a permeabilidade intestinal (Hsiao *et al.*, 2013; Li e Zhou, 2016).

A imagem que se segue (Figura 4) demonstra que, enquanto várias fatores podem influenciar o microbioma, como a dieta e o uso de antimicrobianos, as interações e comunicações entre o SNC e o entérico afetam não só as manifestações comportamentais,

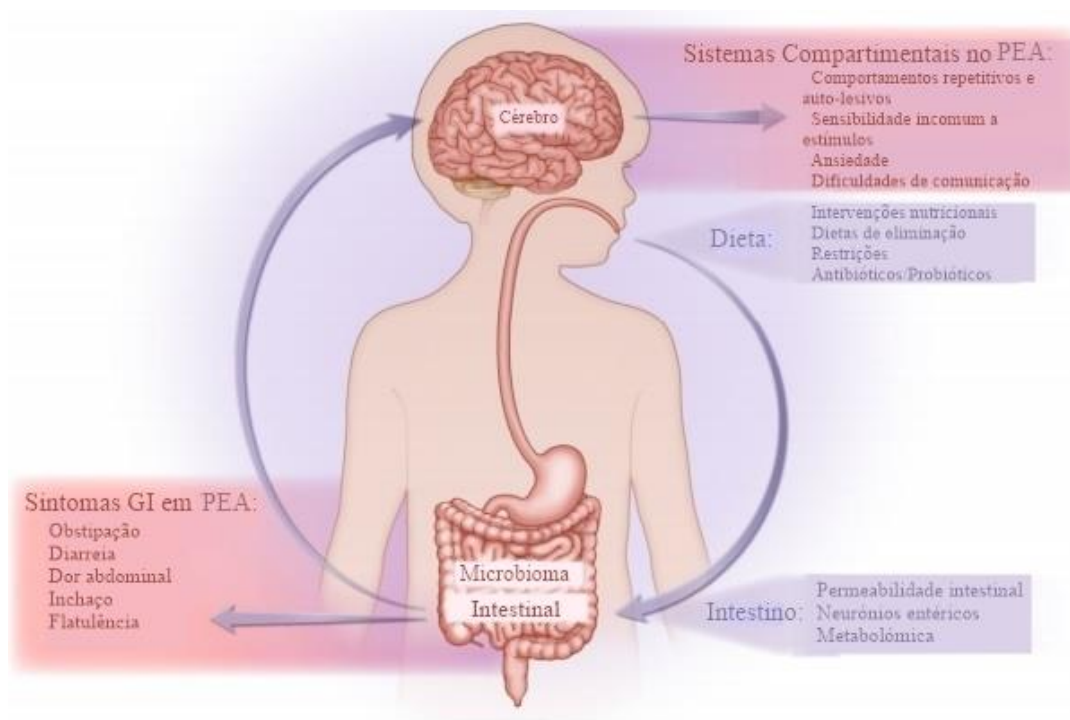


Figura 4: Interações do eixo microbioma-intestino-cérebro em doentes com PEA. Adaptado de Luna *et al.* (2016).

como também a manifestação dos sintomas GI em doentes pediátricos com PEA (Luna *et al.*, 2016).

É deste modo que se constata que a microbiota intestinal, através do eixo intestino-cérebro, modula o desenvolvimento intestinal e, conseqüentemente, produz fenótipos comportamentais. Segundo diversos estudos, o eixo microbiota – intestino – cérebro assume determinada importância na ocorrência e desenvolvimento de PEA. O tratamento de PEA pode então passar por restaurar o equilíbrio deste eixo (Li e Zhou, 2016).

Dois estudos descreveram uma menor diversidade de espécies da microbiota intestinal bem como diferenças na composição bacteriana entre crianças com PEA e grupos controle de crianças saudáveis. Embora as variações de espécies que ocorreram nos dois estudos não sejam as mesmas, os relatos descritos indicam diferenças entre a microbiota intestinal de crianças com PEA e crianças com um desenvolvimento neurológico normal. No entanto, como a função GI das crianças que participaram nos estudos não foi avaliada, não se pôde determinar se estas diferenças microbianas podem estar mais associadas à disfunção GI nas crianças com PEA do que com o próprio diagnóstico de PEA. Sugeriu-se então que as variações da microbiota intestinal entre crianças com PEA e crianças saudáveis se devem a uma composição microbiana associada às PEA e não a uma disfunção GI nas crianças com PEA (Luna *et al.*, 2016).

Contudo, são necessários mais estudos para determinar se a composição microbiana intestinal pode diferir em crianças com PEA, bem como se essas diferenças podem ser ainda maiores se existirem sintomas GI nestas crianças. Caso estudos futuros confirmem uma microbiota intestinal distinta em doentes com PEA e se consiga obter um conhecimento das espécies que diferem especificamente, podem desenvolver-se novas terapias para o tratamento de problemas comportamentais e da disfunção GI em crianças com PEA (Luna *et al.*, 2016).

Um ensaio clínico realizado recentemente avaliou um protocolo modificado de TMF, designado de Terapia de Transferência de Microbiota (TTM), para solucionar os sintomas associados às PEA em 18 crianças entre os 7 e os 16 anos de idade. O tratamento, que durou 7 a 8 semanas, obteve uma taxa de 82% de redução dos sintomas GI, bem como uma grande melhoria nos comportamentos associados às PEA. Foi também observado um aumento significativo da diversidade bacteriana. Este estudo, juntamente com outros

dados pré-clínicos de modelos animais, propõe o TMF como uma potencial terapia emergente capaz de modular os desequilíbrios provocados pela disbiose do eixo microbiota – intestino – cérebro (Staley *et al.*, 2017).

III. Critérios para a realização do Transplante de Microbiota Fecal

III.1. Seleção do dador

Segundo o princípio da precaução, os candidatos à doação de fezes deverão ser cuidadosamente selecionados através de um questionário realizado durante uma entrevista médica com o objetivo de diminuir a probabilidade de transmissão de agentes patogênicos (Andremont *et al.*, 2014). Os principais objetivos desta entrevista são: garantir que o potencial dador esteja saudável, que o processo de doação seja seguro para o recetor e ainda que quaisquer fatores de risco para doenças transmissíveis pelas fezes possam ser identificados. É também importante para identificar fatores de risco para doenças para as quais não existem exames laboratoriais ou para as quais os testes não são suficientemente sensíveis (Bakken *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2015). Esta entrevista médica é também uma oportunidade para educar potenciais dadores sobre a importância de limitar contaminações até ao dia da doação, fornecendo algumas recomendações a esse respeito, sobre a alimentação, as viagens e comportamentos de risco que devem evitar (Andremont *et al.*, 2014).

O questionário existente que avalia o historial de dadores de sangue da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) é considerado como um bom pilar no que diz respeito a limitar o risco de infeções. No entanto, devem ser adicionadas a este questionário medidas que o adaptem à doação de fezes e o insiram no contexto do TMF. Deste modo, é importante recolher não só as informações fornecidas para a doação de sangue mas também as mencionadas na tabela seguinte (Tabela 1). Embora esta tabela mencione as contra-indicações absolutas e relativas para o TMF, é necessário ter em conta primordialmente a gravidade da doença do doente (Andremont *et al.*, 2014; Bakken *et al.*, 2011).

Transplante de Microbiota Fecal

Tabela 1: Questionário de pré-seleção. Adaptado de Andremont et al. (2014), Bakken *et al.* (2011), Batista *et al.* (2015) e Paramsothy *et al.* (2015).

Informações	Critérios de não inclusão absoluta	Critérios de não inclusão relativa a justificar
Risco Infecioso	<ul style="list-style-type: none"> • Infeção por VIH, hepatite B e C; • Exposição conhecida ao VIH ou hepatite viral nos últimos 12 meses e tuberculose prévia ou latente conhecida; • Comportamentos sexuais de alto risco; • Uso de drogas ilícitas; • Tatuagens ou <i>piercings</i> nos últimos 6 meses; • Prisão ou histórico de prisão; • Doença transmissível atual (ex.: infeção do trato respiratório superior); • Risco de Doença de Creutzfeldt-Jakob; • Viagem para uma área endémica de diarreia contagiosa ou onde o risco de diarreia do viajante é elevado nos últimos 6 meses; • Historial de febre tifoide; • Hospitalização no exterior por mais de 24 horas nos últimos 12 meses (incluindo para membros da família); • Residência de vários anos na zona intertropical ou permanecer na mesma durante os 3 meses anteriores à doação. 	
Comorbidades GI	<ul style="list-style-type: none"> • DII; • Síndrome do Intestino Irritável, obstipação crónica idiopática ou diarreia crónica; • Histórico de cancro colorretal ou pólipos; • Episódios de diarreia aguda nos últimos 3 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> • Histórico de cirurgia digestiva (ex.: bypass gástrico); • Histórico familiar de DII, doenças autoimunes e cancro colorretal.
Fatores que podem afetar ou afetam a composição da microbiota intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento com antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirais) ou probióticos nos 3 meses anteriores à doação; • Tratamento com medicamentos imunossupressores; • Tratamentos antineoplásicos sistémicos; • Dador menor de idade (na ausência de argumentos científicos, não deve ser incluído). 	<ul style="list-style-type: none"> • Idade superior a 65 anos; • Índice de Massa Corporal superior a 30 kg/m².
Outros critérios associados ao recetor	<ul style="list-style-type: none"> • Ingestão recente de alergénios aos quais o recetor pode ser sensível (ex: nozes, amendoins). 	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome metabólica; • Doenças autoimunes sistémicas (ex.: esclerose múltipla, doença do tecido conjuntivo); • Doenças atópicas como asma e eczema, e esofagite eosinófila; • Síndrome de dor crónica (ex.: fibromialgia).

Transplante de Microbiota Fecal

Em 2013, um conjunto de organizações de gastroenterologia e doenças infecciosas propôs a realização de diversos testes no soro e nas fezes de doadores para a triagem de infecções, os quais continuam a ser usados na escolha de um doador para TMF. Estas organizações estão interessadas em colaborar com a *Food and Drug Administration* (FDA) no estabelecimento de um protocolo sobre a triagem apropriada de doadores de fezes para o TMF. (Barnes e Park, 2017; North American Society for Pediatric Gastroenterology, 2013). Deste modo, e tendo em conta as diretrizes da FDA para doadores de células, tecidos e produtos baseados em células e tecidos de origem humana, deverão realizar-se os testes listados abaixo nos possíveis doadores de fezes (Bakken *et al.*, 2011).

Os testes a realizar no soro são:

- Teste rápido para deteção de anticorpos IgM contra o vírus da Hepatite A (VHA IgM);
- Teste rápido para deteção do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg);
- Teste rápido para deteção do anticorpo contra o vírus da Hepatite C (Anti – VHC);
- Imunoensaio enzimático ou *Enzyme Immunoassay* (EIA) para deteção de anticorpos contra o VIH tipo 1 e 2;
- Teste rápido de Reagina Plasmática¹ para a deteção de sífilis (*RPR-test*).

Os testes a realizar nas fezes são:

- Deteção da toxina B de *C. difficile* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR); se indisponível, avaliar toxinas A e B por EIA;
- Cultura bacteriana a partir de fezes para a pesquisa de agentes patogénicos entéricos;

¹ O *RPR-test* é um teste de rastreio rápido que não pesquisa anticorpos contra a bactéria *Treponema pallidum*, responsável pela sífilis, mas sim anticorpos contra substâncias libertadas pelas células danificadas por *T. pallidum*, subespécie *pallidum*, como a cardioplipina e a lecitina (Morshed e Singh, 2015).

Transplante de Microbiota Fecal

- Pesquisa do antígeno fecal de *Giardia* e de *Cryptosporidium*;
- Coloração ácido-resistente para *Cyclospora*, *Isospora*, e caso o teste de pesquisa do antígeno estiver indisponível, para *Cryptosporidium*;
- Testes de ovos e parasitas, se o histórico de viagens sugerir;
- Pesquisa do antígeno fecal de *Helicobacter pylori* (no caso de o TMF ser administrado pelas vias GI superiores).

Em 2014, van Nood e os seus colegas incluíram no rastreio de dadores, testes no sangue para o Citomegalovírus (pesquisa de IgG e IgM), para o vírus Epstein-Barr (pesquisa de anticorpos contra o antígeno capsular – IgM anti-VCA e IgG anti-VCA; pesquisa do anticorpo contra o antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr – EBNA), para a Hepatite A (pesquisa de anticorpos totais e pesquisa de anticorpos IgM para a Hepatite A, caso o teste anterior dê positivo num indivíduo não vacinado), para a Hepatite B (pesquisa de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B – anti-HBsAg e do anticorpo nuclear do vírus da Hepatite B total – anti-HBc), para os vírus T-linfotrópicos humanos tipo 1 e 2, e ainda para o protozoário *Entamoeba histolytica* e para o parasita *Strongyloides stercoralis* (van Nood *et al.*, 2014).

A doação de fezes, quando realizada por um parceiro sexual íntimo do doente para fins de TMF, não aumenta significativamente o risco de doenças transmissíveis. Isto porque, teoricamente, nos contactos sexuais íntimos teriam compartilhado fluidos corporais e, consequentemente, a exposição a doenças transmissíveis relevantes (Bakken *et al.*, 2011).

Nesta situação, o médico responsável pela realização do TMF pode ponderar uma versão menos extensa dos testes mencionados acima, o que representa uma vantagem para casos em que o TMF deve ser realizado o mais rápido possível e em que não há tempo para aguardar pelos resultados dos testes, como por exemplo, numa infeção severa ou fulminante por *C. difficile* (Bakken *et al.*, 2011).

Deve ser realizado ainda um exame de sangue basal no dador pré-selecionado que inclua um hemograma completo, níveis de glicemia em jejum, eletrólitos, ureia e creatinina, os testes da função hepática, o teste da proteína C reativa e a taxa de sedimentação de eritrócitos para verificar a presença de alguma doença hematológica, renal, hepática ou

Transplante de Microbiota Fecal

inflamatória que não tivesse sido diagnosticada, para garantir que os dadores são indivíduos saudáveis (Batista *et al.*, 2015; Paramsothy *et al.*, 2015).

Depois de analisar todas as informações contidas no questionário de pré-seleção e na entrevista médica, bem como obter os resultados dos testes realizados no sangue e nas fezes, é necessário decidir se os candidatos estão aptos para a doação de fezes ou não. Entre o dia da pré-seleção e o dia da doação, pode ocorrer alguma contaminação e, por esse motivo, é realizado um segundo questionário no dia anterior à doação. Os pontos que devem ser identificados estão listados na Tabela 2 que se segue (Andremont *et al.*, 2014).

Tabela 2: Questionário de seleção e eventos ocorridos desde a pré-seleção. Adaptado de Andremont *et al.* (2014).

Crítérios de não inclusão	Inclusão com base na apreciação individual
<ul style="list-style-type: none">• Episódios de diarreia (mais de 3 vezes de fezes moles a líquidas por dia);• Situações em risco de contaminação:<ul style="list-style-type: none">○ Viajar para o estrangeiro;○ Contato com sangue humano (<i>piercing</i>, tatuagem, picada, ferida, atendimento odontológico);○ Comportamento sexual de risco;○ Presença de lesões anais (para limitar o risco de transmissão do vírus do papiloma humano e herpes).	<ul style="list-style-type: none">• Procurar os seguintes eventos:<ul style="list-style-type: none">○ Consulta médica (razão);○ Doença contraída (qual, data e duração);○ Toma de medicação (qual e data da última toma).

O período que decorre entre a triagem de dadores e a doação de fezes deverá corresponder ao tempo que é necessário para obter os resultados dos testes realizados nos dadores e ser o mais curto possível, sem que exceda 7 dias, de modo a minimizar o risco de transmissão de agentes patogénicos durante esse período. No caso de congelamento de fezes, este processo limitaria o risco de contaminação. No entanto, não existem dados sobre o impacto que o congelamento e descongelamento de fezes teria na possível alteração da microbiota intestinal viável e, conseqüentemente, na eficácia do TMF nestas condições (Andremont *et al.*, 2014).

O dador é frequente e preferencialmente um membro da família do recetor, isto é, o seu cônjuge ou outro familiar próximo, e esta escolha apresenta a vantagem de diminuir o

risco de transmissão de agentes patogénicos na medida em que o dador e o recetor do TMF partilham o mesmo ambiente e hábitos de vida. No que diz respeito ao consentimento informado, este deve ser realizado por escrito e o médico que prescreve o TMF é o responsável pela informação e consentimento tanto do dador como do recetor (Batista *et al.*, 2015).

III.2. Preparação do recetor

No que diz respeito ao recetor, alguns doentes apresentam comorbidades significativas que devem ser consideradas antes da realização do TMF. No entanto, é muito raro que estas resultem em exclusão. Deve-se ter em conta então algumas condições que aumentam o risco de efeitos adversos, tais como: doentes cuja medicação inclua as principais classes de imunossuppressores, nomeadamente, altas doses de corticosteroides, inibidores da calcineurina, inibidores do alvo da rapamicina nos mamíferos, agentes anti-fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), entre outros; doentes medicados com antineoplásicos quimioterápicos; doentes com cirrose hepática avançada; doentes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA); e doentes que tenham sido submetidos recentemente a um transplante de medula óssea (Bakken *et al.*, 2011).

O TMF é realizado durante 48 horas de internamento do doente e o mesmo deve estar em jejum nas 6 horas anteriores ao TMF. Quando este é administrado por enema ou colonoscopia, recomenda-se o encorajamento por parte dos doentes a reter o material transplantado por pelo menos 30 a 40 minutos, mas preferencialmente por mais de 4 horas. Para este efeito, o doente pode tomar 1 a 2 comprimidos de loperamida, um fármaco que reduz a motilidade intestinal e, deste modo, auxiliar na retenção do material transplantado, imediatamente após o procedimento e 6 horas depois. Quando administrado por sonda nasogástrica, deve administrar-se ao doente um Inibidor da Bomba de Protões (IBP) na noite anterior e na manhã do procedimento (Bakken *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2015).

III.3. Procedimento para a preparação de fezes

Na noite anterior à doação considera-se a administração de um laxante osmótico ao dador, como macrogol, lactulose ou lactitol, com o objetivo de facilitar a colheita e manipulação da amostra (Batista *et al.*, 2015). As fezes são recolhidas no dia do transplante, preferencialmente na unidade de saúde que realiza a preparação, para que o tempo entre

Transplante de Microbiota Fecal

a sua recolha e posterior administração no recetor possa ser reduzido, respeitando um intervalo de menos de 6 horas e nunca excedendo as 24 horas (Batista *et al.*, 2015).

As fezes devem ser recolhidas e armazenadas num recipiente hermeticamente fechado que é imediatamente transportado para o local da preparação. As amostras de fezes podem ser refrigeradas, mas não deve ser congeladas (Bakken *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2015). No que diz respeito aos profissionais envolvidos na mistura e manuseamento do material destinado à transfusão fecal, existem algumas precauções universais que devem ser tomadas como o uso de um fato de proteção com capuz, luvas, máscara resistente a fluidos e óculos de proteção, já que as fezes constituem um risco biológico de nível 2 (Bakken *et al.*, 2011).

O primeiro passo da preparação é diluir as fezes numa solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% a fim de respeitar a isotonia da amostra. Para além disso, pode ser adicionado hélio ou azoto de forma a obter uma solução saturada, diminuindo assim a presença de oxigénio dissolvido. Em vez de NaCl a 0,9%, a amostra de fezes pode também ser diluída em água destilada ou em leite de vaca a 4%. Deste modo, NaCl a 0,9% e leite de vaca a 4% fornecem resultados menos efetivos do que a água destilada (respetivamente 86,2% e 88,6% contra 98,5% para a água destilada). No entanto, as taxas de recorrência para NaCl a 0,9% e leite de vaca a 4% são menores quando comparadas às da água destilada (respetivamente 3,0% e 3,2% contra 7,8% para a água destilada) (Batista *et al.*, 2015).

Seguidamente, é necessário homogeneizar a preparação usando um homogeneizador de laboratório (como por exemplo Sterilmixer® ou Ultra-Turrax®) adicionando a quantidade de diluente necessário para obter uma consistência líquida, evitando a formação de bolhas de ar e, conseqüentemente, a oxigenação da preparação. É de notar que as peças que entram em contacto com as fezes devem ser esterilizadas em autoclave (Batista *et al.*, 2015).

Segue-se a filtração da suspensão fecal, que pode ser realizada através de compressas de gaze de algodão estéreis para remover a máxima quantidade de partículas possível. Uma vez terminada a sua preparação, a solução fecal deve ser administrada imediatamente. Quanto ao volume final que a solução a administrar deve ter, não foi estabelecido um ideal, mas este deve ser adaptado à via de administração: volumes entre 25 e 50 ml devem

ser usados através de sonda nasogástrica e volumes entre 250 a 500 ml devem ser usados em enemas e colonoscopias (Bakken *et al.*, 2011).

Uma vez que as fezes para doação são de composição, volume e densidade variáveis, e não possuem parâmetros físico-químicos e microbiológicos padronizados, é necessário seguir meticulosamente o protocolo de fabricação para garantir a qualidade e reprodutibilidade das preparações. O controlo de qualidade da preparação passa então por avaliar o seu aspeto, as características organolépticas, o volume e a viscosidade, enquanto ainda não foram definidos os critérios de qualidade padronizados, como a densidade e osmolaridade das preparações (Batista *et al.*, 2015).

III.4. Limitações do Transplante de Microbiota Fecal

Para doentes sintomáticos com ICD recorrente e que já foram submetidos à terapia padrão, bem como a outros antibióticos, recorre-se ao TMF. Apesar da falta de palatabilidade da suspensão fecal, os doentes estão dispostos a submeterem-se ao TMF, segundo estudos que se focam no comportamento dos mesmos em relação ao TMF e que concluem que estes são bastante recetivos. No entanto, é necessário ter em conta que o transplante envolve a infusão de uma suspensão microbiologicamente ativa (Vindigni *et al.*, 2013).

O TMF parece ser relativamente seguro a curto prazo, especialmente quanto à sua eficácia demonstrada no tratamento de ICD recorrente. Contudo, as conclusões acerca da segurança a curto prazo devem ser analisadas com alguma precaução, uma vez que os dados derivam de uma série de casos com uma avaliação e acompanhamento variáveis para os efeitos adversos. Além disso, é difícil avaliar se estes provêm da realização do TMF, uma vez que os doentes que o realizam para o tratamento da ICD recorrente apresentam normalmente outras comorbidades (Kelly *et al.*, 2015).

Os efeitos adversos a curto prazo mais comuns incluem desconforto abdominal, inchaço, flatulência, diarreia, obstipação, vômitos, náuseas e febre. Existe apenas um estudo randomizado controlado que compara efeitos adversos num grupo de 16 doentes que realizaram TMF por infusão duodenal com lavagem gástrica com um grupo controlo. Dos 16 doentes, 15 tiveram diarreia, 5 sentiram cólicas abdominais, 3 sofreram de eructação e 1 de náuseas. No grupo controlo não foram referidos quaisquer efeitos adversos (Kelly *et al.*, 2015).

Transplante de Microbiota Fecal

A curto prazo existem ainda alguns efeitos adversos graves que se devem ter em consideração e que estão relacionados com o procedimento utilizado para administrar o TMF (Kelly *et al.*, 2015). Embora sejam raros, podem ocorrer complicações na endoscopia ou colonoscopia, como perfuração e sangramento, bem como complicações cardiopulmonares que podem ser consequência da sedação endovenosa (Kelly *et al.*, 2015; van Nood *et al.*, 2014). A transmissão de agentes patogénicos entéricos é rara mas também pode suceder. Dois casos de infeção por norovírus foram documentados 2 e 12 dias após a realização do TMF. Os autores especulam sobre o modo de transmissão do vírus, colocando a hipótese de um funcionário da unidade de endoscopia estar na origem da transmissão do vírus num dos casos, e no outro a exposição à comunidade, tendo em conta o intervalo de tempo entre o TMF e os sintomas (Kelly *et al.*, 2015; Lagier e Raoult, 2016).

Existem também alguns efeitos adversos a longo prazo, especialmente quando usado em indicações que não a ICD recorrente, com pouca documentação acerca da sua eficácia e segurança. A possível transmissão de agentes infecciosos via TMF ou mesmo o desenvolvimento de doenças relacionadas com alterações na microbiota intestinal constituem potenciais efeitos adversos a longo prazo. Condições como obesidade, diabetes *mellitus*, aterosclerose, DII, cancro do cólon, doença hepática gordurosa não alcoólica, síndrome do intestino irritável, asma e autismo estão relacionadas com alterações na microbiota intestinal (Kelly *et al.*, 2015). As bactérias intestinais estão envolvidas no metabolismo da lecitina obtida através da alimentação, que dá origem ao metabolito N-óxido de trietilamina. Níveis aumentados deste estão associados a um aumento do risco de doenças cardiovasculares, como é o caso da aterosclerose (Kelly *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2013).

É crucial realizar o acompanhamento clínico dos doentes ao longo de vários anos juntamente com a análise de amostras de dadores e recetores para avaliar a possibilidade do TMF estar ou não envolvido na patogénese de várias condições e doenças crónicas (Kelly *et al.*, 2015).

Recentemente, uma revisão analisou 1555 TMFs, dos quais 1190 foram realizados para ICD, e concluiu que os efeitos secundários são raros e, na maioria das vezes, moderados. Os mais observados foram principalmente a nível digestivo: uma taxa de 75% dos doentes com diarreia, 50% com dor abdominal e um pequeno número de doentes sofreu de

Transplante de Microbiota Fecal

obstipação algumas horas após o TMF. Foi descrito um caso de ganho de peso, o que levou à recomendação de que os dadores não devem ter um Índice de Massa Corporal (IMC) superior a 30 kg/m². Também foi relatado um caso fatal de pneumonia por aspiração (Lagier e Raoult, 2016).

IV. Aspetos Regulamentares

A regulamentação do TMF varia muito entre os países de todo o mundo. Existem algumas razões que deixam relutantes os órgãos reguladores quanto à aprovação do TMF, entre elas a falta de estudos clínicos adequados, a percepção de que a população de doentes-alvo é pequena, principalmente em países com uma baixa taxa de infeções por *C. difficile*, a dificuldade de classificar e controlar a microbiota fecal e ainda a falta de reconhecimento do TMF como terapia por parte da comunidade médica convencional (Ma *et al.*, 2017).

Em 2012, a FDA determinou que a administração de fezes constitui um produto biológico e classificou o TMF como um medicamento experimental (Kelly *et al.*, 2015; Stuntz e des Vignes, 2015). Esta classificação gerou insatisfação por parte dos investigadores, uma vez que as fezes humanas, altamente variáveis e amplamente disponíveis, são bastante diferentes dos medicamentos que, por sua vez, são meticulosamente formulados através de métodos reprodutíveis sob condições controladas. Para além disso, as amostras fecais são constituídas por uma diversidade de espécies de microbiota viva e metabolicamente ativas e, por esse motivo, as fezes humanas não podem estar sujeitas às mesmas restrições rigorosas que se aplicam aos medicamentos (Vyas *et al.*, 2015).

Sem vastos estudos controlados randomizados que sustentem a sua eficácia e segurança, o TMF é um produto não aprovado e, para o administrar, a FDA exigiu a aplicação dos ensaios clínicos efetuados para um Novo Medicamento Investigacional (NMI) antes de implementar o procedimento (Kelly *et al.*, 2015; Vyas *et al.*, 2015). As fases de desenvolvimento de um NMI podem levar meses ou mesmo anos até estarem concluídas e esse intervalo de tempo é inaceitável para doentes que necessitem do TMF como tratamento para ICD (Stuntz e des Vignes, 2015). Esse processo moroso de aprovação de um NMI desencorajou os médicos, cientistas e partes interessadas dos doentes a explorar o TMF, que argumentaram que a sua disponibilidade iria ser afetada negativamente por este requisito (Kelly *et al.*, 2015; Vyas *et al.*, 2015). Assim sendo, a FDA alterou esta política e emitiu uma declaração que aprova a realização do TMF para doentes com ICD especificamente, sem que seja necessário passar por todo o processo de um NMI, desde que os provedores obtenham consentimento informado, detalhem os riscos associados ao procedimento e expliquem que o TMF é considerada uma terapia sob investigação. No entanto, não há garantias de que esta diretriz se mantenha em vigor indefinidamente (Kelly *et al.*, 2015; Stuntz e des Vignes, 2015; Vyas *et al.*, 2015). Para outras condições

Transplante de Microbiota Fecal

clínicas em que se investiga o uso do TMF, a FDA exige a aplicação dos ensaios clínicos de um NMI e os dados obtidos neles podem auxiliar na avaliação dos riscos e benefícios associados ao TMF (Vyas *et al.*, 2015).

Uma vez que o TMF não é originado em indústrias farmacêuticas nem criado em laboratório, a sua classificação atual como medicamento em investigação requer regulamentações excessivamente restritas, impossíveis de aplicar ao TMF da mesma forma que se aplicam aos medicamentos convencionais. Se a FDA reclassificasse o TMF na categoria de células, tecidos e produtos baseados em células e tecidos de origem humana, este seria regulado como um tecido humano não vascularizado, da mesma forma que são os ossos, a pele, as córneas e ligamentos. Apesar de os produtos excretados do corpo não estarem incluídos nesta classificação, a FDA pode fazer exceções à regra. Uma vez que classifica o sémen como tecido humano pode fazer uma exceção semelhante para o TMF (Stuntz e des Vignes, 2015).

Classificar as amostras fecais como um tecido humano pode facilitar os limites para promover a pesquisa e ampliar potencialmente o acesso aos cuidados, bem como garantir a segurança através da triagem completa das amostras e manutenção de registos, que são exigidas a todos os tecidos humanos destinados a transplantes (Vyas *et al.*, 2015). No entanto, outros autores rejeitam essa classificação, uma vez que a microbiota fecal é de origem fecal, mas não celular (Batista *et al.*, 2015).

Como o TMF tem uma elevada taxa de cura em diversos estudos com poucos efeitos adversos graves, considerar as fezes como um tecido humano aumentaria o uso do TMF e diminuiria a utilização de antibióticos. Os efeitos adversos a longo prazo associados ao TMF, como a disseminação de doenças infecciosas ou o aumento da suscetibilidade a determinadas condições crónicas, seriam também reduzidos (Vyas *et al.*, 2015).

Assim, a FDA permanece no complexo processo de determinar a forma mais adequada de regulamentar o TMF, bem como de o classificar, e recomenda a médicos e investigadores que planeiam utilizar o procedimento de TMF a aplicação de ensaios clínicos associados a um NMI, mesmo sem que seja requisito em casos de ICD, até que um conjunto abrangente de diretrizes seja estabelecido (Vyas *et al.*, 2015).

Já no Canadá, o departamento federal responsável pela saúde, designado de *Health Canada*, considera o TMF como um “novo medicamento biológico” e requer uma

avaliação do risco/benefício para garantir a qualidade, segurança e eficácia do medicamento, como parte de um ensaio clínico. A terapia é considerada experimental uma vez que nenhuma empresa solicitou autorizações de introdução no mercado para materiais usados na técnica do TMF, o que significa que só pode ser realizada no contexto de ensaio clínico autorizado. Até à data, a ICD é a única indicação para a qual o TMF demonstrou ter eficácia e segurança e para a qual pode ser considerado num contexto que não seja o de ensaio clínico de investigação. Esta política provisória permite aos profissionais de saúde tratar doentes com ICD, que não respondem às terapias convencionais, através do TMF sem ensaios clínicos, desde que as condições de orientação indicadas pela *Health Canada* sejam cumpridas (Gupta *et al.*, 2016; Health Canada, 2015; Kelly *et al.*, 2015).

Na Europa, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) ainda não tomou qualquer tipo de posição quanto à classificação do TMF para o tratamento de ICD. Para outras doenças, o TMF deve ser considerado estritamente experimental, realizado apenas em doentes em ambiente de investigação (Batista *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2015; van Nood *et al.*, 2014). Em França, o TMF satisfaz a definição de medicamento. Na ausência de uma especialidade farmacêutica disponível e adaptada, a Agência Nacional para a Segurança dos Medicamentos e Produtos de Saúde (ANSM) considera que o TMF pode ser utilizado no quadro legislativo e regulamentar aplicável às preparações magistrais e hospitalares, ou aos medicamentos experimentais para um ensaio clínico. A ANSM e a FDA dos EUA utilizam o termo de medicamento, o que não acontece com alguns países e Estados Membros da União Europeia (nomeadamente, o Reino Unido, a Dinamarca e os Países Baixos), nem com certas equipas associadas ao termo de “transplantação de órgãos” (Batista *et al.*, 2015).

A *Therapeutic Goods Administration*, que faz parte do departamento de saúde da Austrália, não fornece informações sobre o TMF, não o considera como um medicamento nem o regulamenta para qualquer indicação ou patologia (Kelly *et al.*, 2015).

V. Formas farmacêuticas para o Transplante de Microbiota Fecal

V.1. Enema de retenção

O enema de retenção é um método pouco invasivo, seguro, mais económico e viável para administração de um TMF em doentes hospitalizados ou em ambulatório e não necessita de anestesia para os doentes (Kassam *et al.*, 2012; Lagier e Raoult, 2016). Além disso, o enema evita também alguns dos riscos associados à colonoscopia ou sonda nasogástrica, como o sangramento e perfuração GI (Kassam *et al.*, 2012). No entanto, alguns doentes podem ter alguma dificuldade em reter o material fecal transplantado, especialmente idosos que apresentam uma diminuição do tónus do esfíncter anal e os enemas não atingem o ângulo esplénico, o que limita o contacto do material fecal com o cólon ascendente e transversal. Por estes motivos, podem ser necessárias várias infusões de pequeno volume ao longo de 2 ou 3 dias (Choi e Cho, 2016; Vindigni *et al.*, 2013).

Um estudo recente avaliou 27 doentes com ICD recorrente ou refratária tratados com enemas de retenção fecal (Vindigni *et al.*, 2013). Os doentes possuíam uma carga de terapia antimicrobiana prolongada e cumulativa e descontinuaram a antibioterapia para a ICD pelo menos 24 horas antes do TMF. Dois doadores saudáveis foram escolhidos para a recolha de aproximadamente 150 g de fezes frescas, posteriormente diluídas em 300 ml de água esterilizada e esta mistura é emulsionada com uma espátula descartável. O conteúdo sobrenadante é administrado aos recetores por via retal em enemas de retenção. Se ocorrer diarreia num período de 7 dias, deve repetir-se o procedimento (Kassam *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos após o TMF demonstraram a eficácia deste tratamento para a ICD recorrente, com uma taxa de resolução clínica de 93% dos doentes. Após o TMF, 22 doentes apresentaram resolução dos sintomas de ICD num prazo de 24 horas. A 5 doentes idosos foi-lhes administrado um segundo enema de retenção, devido à ocorrência de diarreia. Destes, 3 obtiveram resolução dos sintomas mas o TMF acabou por falhar nos outros 2 doentes e especula-se que seja devido ao facto do tónus do esfíncter anal em idosos estar diminuído. Dos recetores do TMF que obtiveram resolução clínica, não foram relatadas recidivas nem efeitos adversos e o acompanhamento dos doentes realizou-se, em média, durante 14 meses (Kassam *et al.*, 2012).

V.2. Formas líquidas para sonda nasogástrica e nasoduodenal

Transplante de Microbiota Fecal

A sonda nasogástrica ou nasoduodenal para administração de um TMF é tecnicamente mais simples de ser realizada, requer uma menor preparação dos doentes e é mais barata quando comparada a outras vias de administração (Brandt, 2013; Vindigni *et al.*, 2013). Os volumes totais das suspensões fecais devem estar compreendidos entre os 25 e os 50 ml, isto é, serem mais pequenos quando comparados aos volumes usados para as vias de administração do trato GI inferior. Deste modo, a probabilidade de vômito e consequente pneumonia por aspiração é diminuída. No entanto, volumes que chegam aos 500 ml foram introduzidos através de uma sonda nasoduodenal durante um período de tempo mais longo (Brandt, 2013; Cammarota *et al.*, 2017).

É de notar que ao administrar o TMF pelas vias nasogástrica, nasoduodenal ou endoscópica quase todo o comprimento do trato GI fica exposto à suspensão fecal. Contudo, existe a preocupação de que quantidades suficientes de bactérias viáveis não atinjam o cólon (Cammarota *et al.*, 2017; Vindigni *et al.*, 2013).

Um estudo retrospectivo de prontuários médicos acerca de 18 doentes com ICD recorrente tratados com TMF por sonda nasogástrica demonstrou uma taxa de cura de 94% após o transplante (Vindigni *et al.*, 2013). Foram obtidas amostras de fezes frescas de doadores saudáveis e utilizaram-se aproximadamente 30 g de fezes para lhes serem adicionados 50 a 70 ml de solução estéril de NaCl a 0,9%. A mistura foi homogeneizada com um liquidificador e posteriormente, filtrou-se por duas vezes a suspensão fecal com filtro de papel, sendo depois colocada em seringas de 25 ml no momento do TMF (Aas *et al.*, 2003).

Os doentes foram tratados com cápsulas de vancomicina 4 dias antes do TMF, sendo que a última dose foi-lhes administrada na noite anterior ao procedimento. Receberam também na noite anterior e na manhã do procedimento um IBP, com o objetivo de diminuir a secreção de ácido no estômago. Na manhã do procedimento posicionou-se uma sonda nasogástrica no estômago dos doentes com o auxílio de uma radiografia abdominal, para verificar se a ponta do tubo fica posicionada no antro gástrico, introduziu-se o conteúdo de uma seringa com suspensão fecal através da sonda e, seguidamente, introduziram-se 25 ml de solução estéril de NaCl a 0,9% para lavagem da sonda. Esta é então retirada e os doentes podem retomar uma dieta normal e as suas atividades físicas imediatamente após o término do internamento (Aas *et al.*, 2003).

Devido às suas condições debilitantes, 2 dos 18 indivíduos estavam gravemente doentes e acabaram por morrer. Outro doente desenvolveu diarreia dias depois do TMF com teste para a toxina de *C. difficile* positivo. Por esse motivo, foi-lhe administrada vancomicina oral, que resultou num desaparecimento da diarreia e o resultado do teste para a toxina de *C. difficile* foi negativo 6 meses depois. Nos restantes 15 doentes não foram observados episódios de diarreia num período de acompanhamento de 90 dias (Aas *et al.*, 2003; Vindigni *et al.*, 2013).

No que diz respeito à administração de um TMF por sonda nasoduodenal, um recente estudo randomizado realizado em 16 doentes com ICD recorrente que receberam uma ou duas infusões de material fecal, obteve uma taxa de cura de 93,8%, com resolução da infeção em 15 dos 16 doentes (van Nood *et al.*, 2013).

V.3. Formas líquidas para colonoscopia

A colonoscopia para administração do TMF é cada vez mais utilizada e apresenta elevadas taxas de sucesso na resolução de ICD recorrente bem como no seu perfil de segurança, quando comparada a outras vias de administração (Cammarota *et al.*, 2017; Vindigni *et al.*, 2013).

Em 2012, um estudo realizado por Kelly e seus colegas apresentou uma série de casos de 26 doentes com ICD recorrente, os quais foram tratados com TMF administrado através de uma colonoscopia. Os doentes descontinuaram a antibioterapia 2 ou 3 dias antes do procedimento, e na noite anterior tomaram um laxante osmótico, a fim de limpar o intestino, de modo a que este esteja pronto para a realização da colonoscopia. Os doentes receberam uma dose de leite de magnésia na noite anterior à doação para obter a consistência de fezes moles e, desta forma, facilitar o processo. Entregam assim uma amostra de fezes frescas num recipiente de plástico e, imediatamente antes da colonoscopia, 6 a 8 colheres dessa amostra são diluídas em aproximadamente 1 litro de água estéril e a suspensão é homogeneizada por uma vigorosa agitação. Esta suspensão é filtrada através de gaze a fim de remover as partículas maiores e, por fim, é distribuída em seringas de 60 ml. Os doentes são submetidos à colonoscopia sob sedação moderada e o colonoscópio atinge o íleo terminal. Durante o procedimento foram documentadas quaisquer anormalidades e realizadas as biópsias necessárias (Kelly *et al.*, 2012).

Transplante de Microbiota Fecal

À medida que o colonoscópio é retirado, a solução fecal é infundida através do canal de biópsias utilizando as seringas de 60 ml, infundindo no total um volume compreendido entre 500 a 960 ml da solução fecal que, na sua maioria, foi entregue ao cólon ascendente. Solicitou-se que os recetores evitassem a evacuação de fezes por 30 a 45 minutos após o TMF e realizou-se o acompanhamento dos doentes num intervalo de 2 a 30 meses (Kelly *et al.*, 2012).

Do total dos doentes, 21 estavam completamente livres de sintomas pós TMF, a maioria relatou melhorias algumas horas ou dias após o procedimento e foram considerados livres de ICD pela ausência de diarreia significativa, febre e dor abdominal; 3 doentes descreveram fezes soltas ou irregulares após o TMF, apesar de o teste para a toxina de *C. difficile* ser negativo e os seus sintomas terem sido autolimitados; 1 doente obteve uma breve doença diarreica dois meses após o TMF causada pela toma de um conjunto de dois antibióticos; e por fim, outro doente que obteve os testes para as toxinas A e B de *C. difficile* negativos, automedicou-se com vancomicina e 11 meses depois do TMF desenvolveu novamente ICD (Kelly *et al.*, 2012).

A administração do TMF através de uma colonoscopia apresenta então algumas vantagens. Para além de servir como método terapêutico, permitindo a infusão direta do material fecal em todo o cólon (inclusive no íleo terminal, onde é mais provável que a *C. difficile* esteja presente), serve também como método de diagnóstico, pois permite a visualização de toda a mucosa do cólon para avaliar a gravidade da doença, detetar alguma patologia que possa coexistir e obter biópsias, sempre que necessário. Para além disso, o conforto dos doentes é assegurado pela sedação a que são submetidos no momento da colonoscopia (Choi e Cho, 2016; Garcia-Garcia-de-Paredes *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2012; Vindigni *et al.*, 2013). Esta mesma sedação pode trazer alguns riscos associados a ela, tais como sangramento e perfuração do cólon podendo levar a infeções. Assim, esta via de administração não deve ser considerada em doentes que sofrem de colite grave (Choi e Cho, 2016; Vindigni *et al.*, 2013).

V.4. Cápsula oral

Recentemente, Youngster e os seus colaboradores referem um estudo que avalia a viabilidade do TMF usando cápsulas fecais congeladas administradas por via oral para tratar 20 doentes com ICD recorrente. As fezes foram então diluídas, filtradas, centrifugadas e suspensas numa solução salina estéril com 10% de glicerol. A solução foi duplamente encapsulada em cápsulas de hipromelose e armazenada a -80°C com um prazo de 6 meses para ser utilizada. Nas 24 a 48 horas anteriores ao TMF, os doentes que o receberam via cápsula oral suspenderam qualquer tratamento contra a ICD. Os doentes receberam então 15 cápsulas em cada um dos dois dias consecutivos com água ou molho de maçã. O total das 30 cápsulas continham material concentrado de uma média de 48 g de fezes (Youngster *et al.*, 2016).

Dos 180 doentes tratados com material fecal proveniente de 7 dadores, passadas 8 semanas, 147 curaram a ICD após a primeira administração de cápsulas fecais (82%) e 26 doentes que tiveram recidiva receberam novamente o TMF, obtendo-se 17 resultados positivos. Deste modo, confirma-se a eficácia e segurança do tratamento de ICD pela administração de cápsulas fecais congeladas, com uma taxa global de cura de 91%, caracterizada pela resolução e ausência de recidivas de diarreia após 8 semanas, com uma ou duas administrações de 30 cápsulas. Após o TMF, a maioria dos doentes referiram alguns sintomas GI autolimitados e as taxas de morte e hospitalização são reflexo das comorbidades dessa população de doentes (Youngster *et al.*, 2016).

Outra experiência relatada por Hecker e pelos seus colegas testa a viabilidade de material fecal congelado para o tratamento de 20 doentes com ICD recorrente através de um TMF via cápsulas orais liofilizadas. Para isso foi usado um único dador saudável, os doentes descontinuaram a terapia para a ICD dois dias antes do TMF, os 8 doentes iniciais receberam um laxante de citrato de magnésio e administraram-se posteriormente 20 a 40 cápsulas contendo aproximadamente 60 mg de material fecal liofilizado, provenientes de 40 g de fezes (Hecker *et al.*, 2016).

Dos 20 doentes com ICD recorrente, 17 obtiveram resolução de diarreia sem recidiva de ICD após um TMF, o que representa uma taxa de cura de 85%. Dos outros 3 doentes, 1 deles obteve resolução após um segundo TMF, outro resolveu após 5 dias de terapia com fidaxomicina e o último manteve o tratamento com vancomicina, uma vez que não obteve

resolução após dois TMF. Não foram descritos efeitos adversos pelos doentes e o tempo médio de acompanhamento dos mesmos foi de 204 dias (Hecker *et al.*, 2016).

Esta técnica de liofilização de material fecal para administração em cápsulas orais apresenta algumas vantagens. Para além de oferecer uma maior palatabilidade na entrega do TMF aos doentes, o processo de liofilização é fácil de executar. Além disso, as preparações de fezes liofilizadas contêm elevadas concentrações de bactérias viáveis, predominantemente anaeróbicas (Hecker *et al.*, 2016).

A administração de cápsulas orais para o TMF tem, de um modo geral, algumas vantagens que incluem o facto de ser uma técnica não invasiva e que, desta forma, elimina os riscos associados ao procedimento e a sua relação custo/benefício é bastante favorável. No entanto, apresentam algumas limitações como a administração das cápsulas requerer a cooperação dos doentes e para os que sofrem de disfagia ou de ausência de motilidade GI, esta via de administração ficará comprometida. Além disso, apesar de serem fáceis de administrar, a preparação das cápsulas é um processo trabalhoso quando comparado ao das preparações para administração endoscópica (Youngster *et al.*, 2016).

V.5. Formas Comerciais

Baseado no trabalho inovador dos fundadores e colaboradores científicos da *Finch Therapeutics*, a plataforma de Microbiota de Espectro Completo™ restaura uma microbiota disbiótica provocada pela toma de antibióticos ou por outras perturbações do microbioma. A OpenBiome está a colaborar com a *Finch Therapeutics* para desenvolver o CP101, o mais recente e principal candidato clínico para tratar doentes com ICD recorrente. Tratam-se de cápsulas orais liofilizadas que poderão ser usadas para tratar ICD recorrente para doentes em que as terapias padrão não resultam (Finch Therapeutics, 2018c; OpenBiome, 2018).

O PRISM 3 é um ensaio clínico que avalia a eficácia e segurança da utilização do CP101 para prevenir a recorrência de ICD em comparação com o placebo, que vai inscrever aproximadamente 200 doentes e esta é a única forma de disponibilidade das cápsulas de TMF, uma vez que é um medicamento experimental e ainda não foi aprovado pela FDA dos EUA para o tratamento da ICD recorrente (Finch Therapeutics, 2018a).

Transplante de Microbiota Fecal

A Tecnologia de Matriz de Emulsão Microbiana da OpenBiome, que ainda possui a sua patente pendente, garante a integridade física das cápsulas a longo prazo ao mesmo tempo que preserva a viabilidade das comunidades microbianas nelas contidas (OpenBiome, 2018).

As cápsulas são de tamanho 00 e, para cada tratamento, o OpenBiome fornece duas cápsulas de teste ‘placebo’. A dose recomendada para o tratamento da ICD recorrente é de 30 cápsulas que devem ser imediatamente engolidas consecutivamente após serem retiradas do congelador onde estão armazenadas, num prazo máximo de 90 minutos, para assim garantir o conforto do doente. Cada dose de 30 cápsulas mais uma cápsula de segurança que é administrada antes de iniciar o tratamento custa 635 dólares americanos (OpenBiome, 2018).

Após a administração do TMF via cápsulas orais é crucial acompanhar os doentes na primeira e quarta semanas, bem como numa visita clínica 8 semanas depois para monitorizar efeitos adversos que possam ter ocorrido e constatar se a resolução da ICD ocorreu (OpenBiome, 2018).

Uma outra plataforma da *Finch Therapeutics* é a de Microbiota Seleccionada Racionalmente™. As terapias associadas a esta plataforma baseiam-se em grupos definidos de microrganismos terapêuticos provenientes de humanos, cuidadosamente seleccionados pela sua capacidade de interagirem com o hospedeiro. O FIN-524 é o primeiro candidato a um produto baseado num conjunto de microrganismos sinteticamente seleccionados para o tratamento da Colite Ulcerosa e utiliza a plataforma *Human-First Discovery* da *Finch Therapeutics* para conseguir identificar as estirpes específicas responsáveis pela eficácia promissora do TMF na Colite Ulcerosa (Finch Therapeutics, 2018d; Finch Therapeutics, 2018b). Estas formas ainda não estão totalmente regulamentadas nem comercializadas pelos canais tradicionais.

De seguida, apresenta-se uma tabela que resume as vantagens e desvantagens de cada forma farmacêutica utilizada para a administração do TMF.

Transplante de Microbiota Fecal

Tabela 3: Vantagens e desvantagens das formas farmacêuticas para administração do Transplante de Microbiota Fecal. Adaptado de Brandt (2013); Cammarota *et al.* (2017); Choi e Cho (2016); Kassam *et al.* (2012); Lagier e Raoult (2016); Vindigni *et al.* (2013); Youngster *et al.* (2016).

Formas Farmacêuticas	Vantagens	Desvantagens
Formas líquidas para sonda nasogástrica	<ul style="list-style-type: none"> • Método económico; • O material fecal atinge quase todo o comprimento do trato GI; • Utilizam-se volumes de infusão pequenos entre 25 e 50 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Risco de vômito e aspiração; • Risco de pneumonia por aspiração; • Quantidade de bactérias viáveis que atingem o cólon pode não ser suficiente; • Requer a realização de uma radiografia abdominal para verificar a posição da sonda.
Formas Líquidas para sonda nasoduodenal	<ul style="list-style-type: none"> • O material fecal atinge quase todo o comprimento do trato GI; • Utilizam-se pequenos volumes de infusão (25 a 50 ml). 	<ul style="list-style-type: none"> • Risco de vômito e aspiração; • Risco de pneumonia por aspiração; • Requer a realização de uma radiografia abdominal para verificar a posição da sonda.
Formas Líquidas para Esofagogastroduodenoscopia	<ul style="list-style-type: none"> • O material fecal atinge quase todo o comprimento do trato GI; • O conforto do paciente é assegurado pela anestesia; • Permite a visualização da mucosa do estômago e duodeno; • Permite a realização de biópsias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de sedação do paciente; • Risco mínimo de sangramento na obtenção de biópsias; • Risco mínimo de perfuração do esófago, estômago ou duodeno; • Pode ocorrer sensibilização da garganta após o exame.
Formas líquidas para Colonoscopia	<ul style="list-style-type: none"> • Permite a visualização de toda a mucosa do cólon; • Permite a realização de biópsias; • O conforto do paciente é assegurado pela anestesia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de sedação do paciente; • Risco de sangramento e perfuração do intestino.
Enema de retenção	<ul style="list-style-type: none"> • Método económico e pouco invasivo; • Não necessita de anestesia; • Não existe risco de sangramento nem perfuração do intestino. 	<ul style="list-style-type: none"> • Distribuição do material fecal não é uniforme; • Aumento do risco de supercrescimento de bactérias do cólon no intestino delgado; • Doentes com tónus do esfíncter anal diminuído têm dificuldade em reter o material transplantado; • Necessidade de várias infusões de pequeno volume.

Transplante de Microbiota Fecal

Tabela 4: Vantagens e desvantagens das formas farmacêuticas para administração do Transplante de Microbiota Fecal (continuação). Adaptado de Brandt (2013); Cammarota *et al.* (2017); Choi e Cho (2016); Kassam *et al.* (2012); Lagier e Raoult (2016); Vindigni *et al.* (2013); Youngster *et al.* (2016).

Cápsula oral de fezes frescas, congeladas ou liofilizadas	<ul style="list-style-type: none">• Não é necessário sedar o paciente;• Técnica de administração não invasiva;• Relação custo/benefício favorável;• Redução do número e da frequência de exames de doadores no caso de material congelado;• Fácil de administrar aos doentes, uma vez que melhora a palatabilidade;• Elevadas concentrações de bactérias anaeróbicas viáveis em preparações de fezes liofilizadas;• Existência de um ensaio clínico para administração de cápsulas orais liofilizadas (PRISM 3).	<ul style="list-style-type: none">• A preparação das cápsulas requer um procedimento trabalhoso e moroso;• A administração das cápsulas requer a cooperação do paciente;• Não recomendável para doentes que sofrem de disfagia ou que não apresentam motilidade intestinal.
--	--	---

Conclusão

O TMF tem demonstrado eficácia no tratamento da ICD recorrente nos doentes em que a antibioterapia com vancomicina, metronidazol ou fidaxomicina falha. O transplante de material fecal de um dador saudável para um recetor doente ajuda no restabelecimento da microflora intestinal, mas o mecanismo pelo qual atua ainda não está esclarecido (Bourlioux *et al.*, 2015). Determinar a relação entre a microbiota intestinal e vários aspetos como o genótipo do hospedeiro, a dieta alimentar, o ambiente em que vive e a resposta do sistema imunológico é importante e deverá ser tópico de estudo (Vyas *et al.*, 2015). É também necessário compreender as diferenças existentes nas respostas ao TMF entre géneros, faixas etárias, populações geográficas e indivíduos imunocomprometidos (Vindigni *et al.*, 2013).

A microbiota intestinal demonstrará a sua importância na saúde humana, na modulação do gasto energético, na inflamação e na resistência ou suscetibilidade a várias doenças, GI ou não (Brandt, 2013). Por este motivo, existe também a necessidade de esclarecer quais as comunidades microbianas ideais para o tratamento de várias infeções, para assim os investigadores poderem cultivar e transplantar misturas bem caracterizadas e personalizadas de microrganismos. Estas comunidades sintéticas de microrganismos demonstraram a sua eficácia no combate à ICD que é maior do que a de probióticos convencionais, na medida em que colonizam o intestino a longo prazo. Deste modo, a administração destas misturas pré formadas poderiam tornar-se num tratamento preferido (Vyas *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao método de administração do TMF, existem também alguns avanços. Um exemplo disso é a possível administração de material fecal através de cápsulas orais liofilizadas, que está a ser estudado no ensaio clínico PRISM 3 e que apresenta algumas vantagens: não requerem uma grande preparação do doente, o conforto deste durante o procedimento será maior do que por vias invasivas como a colonoscopia ou sonda nasogástrica, a realização do procedimento não necessita de sedação do doente e é de fácil execução (Bourlioux *et al.*, 2015).

Muitas questões sobre o TMF continuam ainda sem respostas. Por esta razão, é crucial facilitar a comparação entre experiências e alargar o conhecimento já existente sobre os protocolos de preparação e de controlo farmacêutico através de gastroenterologistas,

Transplante de Microbiota Fecal

microbiologistas e farmacêuticos hospitalares. As agências reguladoras nacionais poderão tomar decisões apropriadas e validar os protocolos combinando estas considerações com a pesquisa de um consenso científico (Bourlioux *et al.*, 2015).

Bibliografia

- Aas, J.; Gessert, C. E. e Bakken, J. S. (2003). Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis*, 36, pp. 580-585.
- Andremont, A.; Barbut, F.; Bardou, M., *et al.* (2014). La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques. *Agence internationale de sécurité du médicament et des produits de santé*, pp. 1-14.
- Bakken, J. S.; Borody, T.; Brandt, L. J., *et al.* (2011). Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9, pp. 1044-1049.
- Barnes, D. e Park, K. T. (2017). Donor Considerations in Fecal Microbiota Transplantation. *Curr Gastroenterol Rep*, 19, pp. 10.
- Batista, R.; Kapel, N.; Megerlin, F., *et al.* (2015). [Fecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infections. Framework and pharmaceutical preparation aspects]. *Ann Pharm Fr*, 73, pp. 323-331.
- Binda, C.; Lopetuso, L. R.; Rizzatti, G., *et al.* (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis*, 50, pp. 421-428.
- Bonaz, B.; Bazin, T. e Pellissier, S. (2018). The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci*, 12, pp. 49.
- Borody, T. J. e Campbell, J. (2012). Fecal microbiota transplantation: techniques, applications, and issues. *Gastroenterol Clin North Am*, 41, pp. 781-803.
- Borody, T. J. e Khoruts, A. (2011). Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9, pp. 88-96.
- Borody, T. J.; Paramsothy, S. e Agrawal, G. (2013). Fecal microbiota transplantation: indications, methods, evidence, and future directions. *Curr Gastroenterol Rep*, 15, pp. 337.
- Bourlioux, P.; Antoine, J. M.; Artiges, A., *et al.* (2015). Faecal microbiota transplantation: Key points to consider. *Ann Pharm Fr*, 73, pp. 163-168.
- Brandt, L. J. (2013). American Journal of Gastroenterology Lecture: Intestinal microbiota and the role of fecal microbiota transplant (FMT) in treatment of *C. difficile* infection. *Am J Gastroenterol*, 108, pp. 177-185.
- Braniste, V.; Al-Asmakh, M.; Kowal, C., *et al.* (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*, 6, pp. 1-12.
- Cammarota, G.; Ianiro, G.; Tilg, H., *et al.* (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66, pp. 569-580.

- Cao, Y.; Zhang, B.; Wu, Y., *et al.* (2018). The Value of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Ulcerative Colitis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract*, 2018, pp. 1-12.
- Choi, H. H. e Cho, Y. S. (2016). Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc*, 49, pp. 257-265.
- De Groot, P. F.; Frissen, M. N.; De Clercq, N. C., *et al.* (2017). Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes*, 8, pp. 253-267.
- Evrensel, A. e Ceylan, M. E. (2016). Fecal Microbiota Transplantation and Its Usage in Neuropsychiatric Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 14, pp. 231-237.
- Finch Therapeutics (2018a). *CP101* [Em linha]. Disponível: <https://finchtherapeutics.com/cp101/#> [Consultado em Data 15/10/2018].
- Finch Therapeutics (2018b). *FIN-524* [Em linha]. Disponível: <https://finchtherapeutics.com/fin524/> [Consultado em Data 15/10/2018].
- Finch Therapeutics (2018c). *Plataforma Full-Spectrum Microbiota* [Em linha]. Disponível: <https://finchtherapeutics.com/fsm/> [Consultado em Data 15/10/2018].
- Finch Therapeutics (2018d). *Plataforma Microbiota Seleccionada Racionalmente* [Em linha]. Disponível: <https://finchtherapeutics.com/rsm/> [Consultado em Data 15/10/2018].
- Finegold, S. M. (2011). Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism. *Med Hypotheses*, 77, pp. 270-274.
- Garcia-Garcia-De-Paredes, A.; Rodriguez-De-Santiago, E.; Aguilera-Castro, L., *et al.* (2015). [Fecal microbiota transplantation]. *Gastroenterol Hepatol*, 38, pp. 123-134.
- Ghose, C. (2013). Clostridium difficile infection in the twenty-first century. *Emerg Microbes Infect*, 2, pp. 62.
- Gupta, S.; Allen-Vercoe, E. e Petrof, E. O. (2016). Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therap Adv Gastroenterol*, 9, pp. 229-239.
- Health Canada (2015). *Guidance Document: Fecal Microbiota Therapy Used in the Treatment of Clostridium difficile Infection Not Responsive to Standard Therapies* [Em linha]. Disponível: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/public-involvement-consultations/biologics-radiopharmaceuticals-genetic-therapies/guidance-document-regulation-fecal-microbiota-therapy.html> [Consultado em Data 08/10/2018].
- Heath, R. D.; Cockerell, C.; Mankoo, R., *et al.* (2018). Fecal microbiota transplantation and its potential therapeutic uses in gastrointestinal disorders. *North Clin Istanb*, 5, pp. 79-88.

Transplante de Microbiota Fecal

- Hecker, M. T.; Obrenovich, M. E.; Cadnum, J. L., *et al.* (2016). Fecal Microbiota Transplantation by Freeze-Dried Oral Capsules for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Open Forum Infect Dis*, 3, pp. 1-2.
- Hsiao, E. Y.; McBride, S. W.; Hsien, S., *et al.* (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155, pp. 1451-1463.
- Juul, F. E.; Garborg, K.; Bretthauer, M., *et al.* (2018). Fecal Microbiota Transplantation for Primary *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med*, 378, pp. 2535-2536.
- Kassam, Z.; Hundal, R.; Marshall, J. K., *et al.* (2012). Fecal transplant via retention enema for refractory or recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med*, 172, pp. 191-193.
- Kelly, C. P. e Lamont, J. T. (2008). *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N Engl J Med*, 359, pp. 1932-1940.
- Kelly, C. R.; De Leon, L. e Jasutkar, N. (2012). Fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection in 26 patients: methodology and results. *J Clin Gastroenterol*, 46, pp. 145-149.
- Kelly, C. R.; Kahn, S.; Kashyap, P., *et al.* (2015). Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology*, 149, pp. 223-237.
- Kim, D. H. e Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune Netw*, 17, pp. 25-40.
- Lagier, J. C. e Raoult, D. (2016). [Fecal microbiota transplantation: indications and perspectives]. *Med Sci (Paris)*, 32, pp. 991-997.
- Lane, E. R.; Zisman, T. L. e Suskind, D. L. (2017). The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *J Inflamm Res*, 10, pp. 63-73.
- Levinson, W. (2016). *Microbiologia Médica e Imunologia*, Brasil, AMGH Editora Ltda.
- Li, D.; Wang, P.; Wang, P., *et al.* (2016). The gut microbiota: A treasure for human health. *Biotechnol Adv*, 34, pp. 1210-1224.
- Li, Q. e Zhou, J. M. (2016). The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, 324, pp. 131-139.
- Lofland, D.; Josephat, F. e Partin, S. (2013). Fecal transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Lab Sci*, 26, pp. 131-135.
- Luna, R. A.; Savidge, T. C. e Williams, K. C. (2016). The Brain-Gut-Microbiome Axis: What Role Does It Play in Autism Spectrum Disorder? *Curr Dev Disord Rep*, 3, pp. 75-81.
- Ma, Y.; Liu, J.; Rhodes, C., *et al.* (2017). Ethical Issues in Fecal Microbiota Transplantation in Practice. *Am J Bioeth*, 17, pp. 34-45.

- Malin, M.; Suomalainen, H.; Saxelin, M., *et al.* (1996). Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab*, 40, pp. 137-145.
- Moayyedi, P. (2016). Fecal transplantation: any real hope for inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol*, 32, pp. 282-286.
- Morgan, X. C. e Huttenhower, C. (2014). Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology*, 146, pp. 1437-1448.
- Morshed, M. G. e Singh, A. E. (2015). Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol*, 22, pp. 137-147.
- Ng, K. M.; Ferreyra, J. A.; Higginbottom, S. K., *et al.* (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*, 502, pp. 96-99.
- North American Society for Pediatric Gastroenterology, H. a. N. (2013). *Current Consensus Guidance on Donor Screening and Stool Testing for FMT* [Em linha]. Disponível: [https://www.naspgan.org/files/documents/Joint_Scty_Sign-on_FDA%20FMT_final%207.15.13%20\(1\).pdf](https://www.naspgan.org/files/documents/Joint_Scty_Sign-on_FDA%20FMT_final%207.15.13%20(1).pdf) [Consultado em Data 11/09/2018].
- Openbiome. (2018). *FMT Capsules* [Em linha]. Disponível: <https://www.openbiome.org/fmtcapsules/> [Consultado em Data 15/10/2018].
- Paramsothy, S.; Borody, T. J.; Lin, E., *et al.* (2015). Donor Recruitment for Fecal Microbiota Transplantation. *Inflamm Bowel Dis*, 21, pp. 1600-1606.
- Parracho, H. M.; Bingham, M. O.; Gibson, G. R., *et al.* (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol*, 54, pp. 987-991.
- Petrosillo, N.; Granata, G. e Cataldo, M. A. (2018). Novel Antimicrobials for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Front Med (Lausanne)*, 5, pp. 96.
- Quigley, E. M. M. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17, pp. 94.
- Sharma, S. K.; Yip, C.; Esposito, E. X., *et al.* (2018). The Design, Synthesis, and Characterizations of Spore Germination Inhibitors Effective against an Epidemic Strain of *Clostridium difficile*. *J Med Chem*, 61, pp. 6759-6778.
- Smits, L. P.; Bouter, K. E.; De Vos, W. M., *et al.* (2013). Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology*, 145, pp. 946-953.
- Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L., *et al.* (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, pp. 16731-16736.
- Song, Y.; Liu, C. e Finegold, S. M. (2004). Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*, 70, pp. 6459-6465.

- Staley, C.; Khoruts, A. e Sadowsky, M. J. (2017). Contemporary Applications of Fecal Microbiota Transplantation to Treat Intestinal Diseases in Humans. *Arch Med Res*, 48, pp. 766-773.
- Stuntz, M. e Des Vignes, F. (2015). Treating Clostridium difficile infections: Should fecal microbiota transplantation be reclassified from investigational drug to human tissue? *Contemp Clin Trials Commun*, 1, pp. 39-41.
- Su, H. J.; Chiu, Y. T.; Chiu, C. T., *et al.* (2018). Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. *J Formos Med Assoc*.
- Surawicz, C. M.; Brandt, L. J.; Binion, D. G., *et al.* (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. *Am J Gastroenterol*, 108, pp. 478-498.
- Tang, W. H.; Wang, Z.; Levison, B. S., *et al.* (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 368, pp. 1575-1584.
- Van Nood, E.; Speelman, P.; Nieuwdorp, M., *et al.* (2014). Fecal microbiota transplantation: facts and controversies. *Curr Opin Gastroenterol*, 30, pp. 34-39.
- Van Nood, E.; Vrieze, A.; Nieuwdorp, M., *et al.* (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med*, 368, pp. 407-415.
- Vindigni, S. M.; Broussard, E. K. e Surawicz, C. M. (2013). Alteration of the intestinal microbiome: fecal microbiota transplant and probiotics for Clostridium difficile and beyond. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 7, pp. 615-628.
- Vitikainen, K.; Haapamaki, J.; Farkkila, M., *et al.* (2018). Clostridium difficile infection in patients with inflammatory bowel disease: a case control study. *Scand J Gastroenterol*, pp. 1-5.
- Vyas, D.; Aekka, A. e Vyas, A. (2015). Fecal transplant policy and legislation. *World J Gastroenterol*, 21, pp. 6-11.
- Weingarden, A. R.; Chen, C.; Bobr, A., *et al.* (2014). Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent Clostridium difficile infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306, pp. 310-319.
- Youngster, I.; Mahabamunuge, J.; Systrom, H. K., *et al.* (2016). Oral, frozen fecal microbiota transplant (FMT) capsules for recurrent Clostridium difficile infection. *BMC Med*, 14, pp. 134.