

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TRANSPLANTE DE
MICROBIOTA FECAL FRESCO E TRANSPLANTE DE FEZES
ESTERILIZADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ENTEROCOLITE NECROSANTE NEONATAL**

CHRISTIAN PRADO

CRICIÚMA

2021

CHRISTIAN PRADO

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TRANSPLANTE DE
MICROBIOTA FECAL FRESCO E TRANSPLANTE DE FEZES
ESTERILIZADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ENTEROCOLITE NECROSANTE NEONATAL**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção de título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Cristiane Ritter

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

CRICIÚMA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P896a Prado, Christian.

Análise comparativa entre transplante de microbiota fecal fresco e transplante de fezes esterilizadas em modelo experimental de enterocolite necrosante neonatal / Christian Prado. - 2021.

60 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Cristiane Ritter.

Coorientação: Felipe Dal Pizzol.

1. Enterocolite necrosante. 2. Transplante de microbiota fecal. 3. transplante de fezes esterilizadas. 4. Probióticos. 5. Intestinos - Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 616.34



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DA 136ª DEFESA DE TESE

Ata da Defesa Pública da Tese de Doutorado de Christian de Escobar Prado. No dia dez do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e um às 14h, reuniram-se via ferramenta digital *Google Meet* os membros da Banca Examinadora, composta pelos(as) senhores(as) professores(as): **Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila** (Membro Relator – UNESC), **Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno** (Membro Interno – UNESC), **Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Externo – UNISUL) e **Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto** (Membro Externo – USP), e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüirem a tese de Doutorado de **Christian de Escobar Prado**, subordinada ao título: “ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL FRESCO E TRANSPLANTE DE FEZES ESTERILIZADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENTEROCOLITE NECROSANTE NEONATAL”. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube ao candidato, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para avaliação final do candidato. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Tese, declarou **Christian de Escobar Prado** APROVADO.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Emilio Luiz Streck

Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Cristiane Ritter

Profa. Dra. CRISTIANE RITTER (Orientadora)

Felipe Dal Pizzol

Prof. Dr. FELIPE DAL PIZZOL (Coorientador)

BANCA EXAMINADORA:

Ricardo Andrez Machado de Ávila

Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA (Membro Relator - UNESC)

Alexandra Ioppi Zugno

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO (Membro Interno – UNESC)

Fabricia Cardoso Petronilho

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO (Membro Externo – UNISUL)

Lourenço Sbragia Neto

Prof. Dr. LOURENÇO SBRAGIA NETO (Membro Externo – USP)

CANDIDATO:

Christian de Escobar Prado

CHRISTIAN DE ESCOBAR PRADO

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Dra. Cristiane Ritter e Dr. Felipe Dal Pizzol pelos ensinamentos, apoio e construção dessa pesquisa. Vocês são exemplos de médicos, cientistas e humanistas, demonstrado sobremaneira na pandemia do COVID-19, onde lideraram os esforços no entendimento da doença, sua prevenção e tratamento dos pacientes graves. Nesse momento único em nossa geração, mesmo sobrecarregados de responsabilidades, continuaram orientando seus pós-graduandos e dando direção às pesquisas do laboratório de fisiopatologia da UNESC.

Agradeço aos meus colegas do PPGCS, aos professores do programa, e aos colegas do FISIOPAT, os quais agregaram seus conhecimentos e especialidades realizando as análises que foram fundamentais para a pesquisa. Entre meus colegas, agradeço especialmente a Dra. Monique Michels pelos ensinamentos, auxílio na orientação e motivação do experimento.

Por fim agradeço à Universidade do Extremo-Sul Catarinense por possibilitar a realização de meus sonhos, ser professor, mestre e agora doutor. Instituição que apoia seus funcionários e alunos, com forte atuação em pesquisa científica e extensão, sendo um verdadeiro motor de desenvolvimento regional.

Dedico esta tese à minha esposa Raquel e meu filho Lucas, vocês são todo meu amor.

RESUMO

Introdução: A enterocolite necrosante (ECN) é uma doença intestinal grave que acomete neonatos prematuros, causando mortalidade elevada, a despeito de todos os avanços em terapia intensiva neonatal. A doença tem causa multifatorial, onde os episódios de isquemia e reperfusão, bem como as alterações causadas na microbiota intestinal imatura, conhecidas como disbiose, apresentam papel fundamental. Nesse sentido, a correção da disbiose, com transplante de microbiota fecal (TMF), tem demonstrado efeitos benéficos em modelos experimentais da doença. Ainda, as variadas formas de administração e conservação do material do TMF, diferentes resultados a depender do doador, bem como a segurança do procedimento, levam a questionamentos sobre a terapia. **Objetivo:** Comparar o efeito do TMF fresco, transplante de fezes esterilizadas (TFE) e o uso de probióticos sobre a lesão tecidual, inflamação e estresse oxidativo em modelo neonatal de ECN. **Métodos:** Para o estudo foram utilizados animais recém-nascidos da linhagem *Wistar*, os quais foram submetidos a um modelo de hipóxia e gavagem, com protocolo já descrito para mimetizar um quadro de ECN. Os animais foram divididos em cinco grupos: Controle; ECN; ECN+TMF; ECN+TFE e ECN+ probióticos. Análises foram realizadas a fim de identificar se as fezes nestas duas formas de administração foram efetivas para diminuir lesão tecidual, resposta inflamatória e lesão oxidativa causada pela ECN em cérebro, intestino e soro. Foi avaliada se a eficácia era semelhante a administração de probióticos. **Resultados:** As citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas no grupo ECN e os níveis de IL-10 estão diminuídos no intestino, cérebro e soro. TMF fresco e fezes estéreis foram mais eficazes em reduzir a inflamação quando são comparados ao uso de probióticos. O dano oxidativo e histológico no intestino são aparentes no grupo ECN e ambos os tratamentos baseados em fezes tiveram efeito protetor. **Conclusão:** Ambos TMF e fezes estéreis são eficazes na redução da resposta inflamatória, dano oxidativo e lesão histológica, no intestino e cérebro, quando comparado ao tratamento com probióticos, em modelo experimental de ECN. Possivelmente esse efeito benéfico se deva a debris bacterianos, proteínas, compostos antimicrobianos, produtos do metabolismo, oligonucleotídeos, e nanopartículas, além da própria microbiota em si. A utilização de fezes esterilizadas teoricamente proporciona maior segurança para prática clínica, com efeito muito similar ao TMF.

Palavras-chave: Enterocolite necrosante; Transplante de microbiota fecal; probiótico; fezes esterilizadas

ABSTRACT

Introduction: Necrotizing enterocolitis (NEC) is a serious intestinal disease that affects premature neonates, causing high mortality, despite all advances in neonatal intensive care. The disease has a multifactorial cause, where episodes of ischemia and reperfusion, as well as changes caused in the immature intestinal microbiota, known as dysbiosis, play a fundamental role. In that regard, the correction of dysbiosis with fecal microbiota transplantation (FMT) has shown beneficial effects in experimental models of the disease. Still, different forms of administration and conservation of FMT material, different results depending on the donor, as well as the safety of the procedure, lead to questions about the therapy. **Objective:** To compare the effect of fresh FMT, sterile stool transplant (SST) and the use of probiotics on tissue damage, inflammation and oxidative stress in a neonatal NEC model. **Methods:** Newborn animals of the *Wistar* lineage were used for the study, which were submitted to hypoxia and fed by gavage, with a protocol similar to the NEC. The animals were divided into five groups: Control; NEC + saline; NEC + FMT; NEC + SST and NEC + probiotics. Analyses were performed in order to identify which of the two forms of FMT administration would be effective in decreasing tissue damage, inflammatory response and oxidative damage caused by NEC in brain, gut and serum. It was evaluated whether the effectiveness is similar to probiotics. **Results:** Pro-inflammatory cytokines are increased in the NEC group and IL-10 levels are decreased in gut, brain and serum. Fresh FMT and sterile stool transplant were more effective in reducing inflammation when compared to probiotics. Oxidative and histological damage in gut are clear in the NEC group and both stool-based treatments had a protective effect. **Conclusion:** Both TMF and sterile feces are effective in reducing the inflammatory response, oxidative damage and histological damage, in the intestine and brain, when compared to treatment with probiotics. Possibly this beneficial effect is due to bacterial debris, proteins, antimicrobial compounds, products of metabolism, oligonucleotides, and nanoparticles, in addition to the microbiota itself. The use of sterilized feces theoretically provides greater safety for clinical practice, with an effect very similar to TMF.

Key-words: Necrotizing enterocolitis; Fecal microbiome transplantation; probiotic; sterile feces.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Células Apresentadoras de antígenos
BHE – Barreira Hematoencefálica
BFS – Bactérias filamentosas segmentadas
COX-2 – Ciclooxygenase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ECN – Enterocolite necrosante
EGF – Fator de crescimento epidérmico
eONS - Óxido nítrico endotelial
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio
FAP – Fator de ativação plaquetária
FDA – do inglês *Food and Drug Administration*
GF – do inglês *Germ-Free*
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HB-EGF - Fator de crescimento epidérmico ligante a heparina
HMGB1 – do inglês *High-mobility group box 1*
HSB – Hidrolases dos sais biliares
IL - Interleucina
iONS - Óxido nítrico induzível
irCD – infecção recorrente por *Clostridium difficile*
LPS – Lipopolissacarídeo
MDA – malondialdeído
NFκB – Fator de transcrição nuclear κB
NK – do inglês *natural killer*
nONS – Óxido nítrico neuronal
O₂⁻ – Anion superóxido
ON – Óxido nítrico
ONOO⁻ - Peroxidonitrito
PBS – Tampão fosfato
PMAP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
RN – Recém nascido
RRP – Receptores de Reconhecimento Padrão
SNC – Sistema Nervoso Central

TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbiturico

TGI – Trato Gastro Intestinal

TH – do inglês *T-helper*

TFE – Transplante de microbiota estéril

TLR – do inglês *Toll-like receptors*

TMF – Transplante de microbiota fecal fresco

TNF – Fator de necrose tumoral

UTIneo – Unidade de Terapia Intensiva neonatal

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Impacto da microbiota intestinal através do eixo intestino-cerebral em estados saudáveis e de doença ou estresse.....	22
Figura 2: Esquema simplificado da metodologia.....	32
Figura 3: Crescimento de colônias bacterianas de fezes expostas a diferentes tempos de luz U.V. para padronização de TFE.....	35
Figura 4: Níveis de citocinas em soro de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos.....	37
Figura 5: Atividade da mieloperoxidase e níveis de citocinas em cérebro de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos.....	38
Figura 6: Atividade da mieloperoxidase e níveis de citocinas em intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.....	39
Figura 7: Dano oxidativo a lipídeos em cérebro e intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.....	40
Figura 8: Dano oxidativo a proteínas em cérebro e intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.....	40
Figura 9: Presença de óxido nítrico em cérebro e intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.....	41
Figura 10: Lesão tecidual em intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem das colônias.....	36
Tabela 2: Análise histológica no intestino delgado.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 QUADRO CLÍNICO DA ENTEROCOLITE NECROSANTE.....	14
1.2 LESÃO DA BARREIRA MUCOSA INTESTINAL	15
1.3 MICROBIOTA	18
1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DO EIXO INTESTINO-CÉREBRO	21
1.5 MECANISMO DE LESÃO DO SNC NA ECN	24
1.6 TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL.....	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 ANIMAIS – ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.2 INDUÇÃO DE ECN E TRATAMENTOS	30
3.3.PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO DE FEZES.....	31
3.4.DESENHO EXPERIMENTAL	31
3.5 NÍVEIS DE CITOCINAS	33
3.6 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	33
3.7 NITRITO/NITRATO	33
3.8 DANO OXIDATIVO	33
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	34
3.10 HISTOLOGIA	34
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A Enterocolite Necrosante (ECN) é uma doença multifatorial que acomete o trato gastrointestinal do recém-nascido (RN), provocando necrose parcial ou completa da parede gastrointestinal (de Souza, 2008; Besner, 2014). A doença ocorre em 90% dos casos nos primeiros 10 dias de vida, sendo que o risco de ser acometido é inversamente proporcional ao peso e idade gestacional (de Souza, 2008; Coran, 2012; Besner, 2014). É uma patologia principalmente de neonatos prematuros, chegando a atingir 10% dos recém-nascidos com menos que 1500 gramas, dos quais 20 a 30% não sobrevivem (Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013; Karadag et al., 2015; Yu et al., 2015). À medida que a sobrevivência dos prematuros extremos, àqueles com menos de 28 semanas de gestação ou 1000 gramas, continua a aumentar, a incidência de complicações da prematuridade como a ECN, também estão aumentando (Mollen et al., 2008; Radulescu et al., 2009).

A despeito extraordinários avanços no atendimento de terapia intensiva neonatal (UTINeo), nos últimos vinte anos não houve melhora significativa na mortalidade dos pacientes com ECN (Rich et al., 2017). Os principais tratamentos disponíveis hoje se restringem a antibióticos, cirurgia e suporte avançado de vida, até que a resposta inflamatória e a necrose cessem (de Souza, 2008; Coran, 2012; Rich et al., 2017). Em virtude disso, a pesquisa em relação a patogênese da doença e a prevenção da mesma, tem sido o principal objetivo de muitos pesquisadores (Besner, 2014). É reconhecido o papel do leite materno e da microbiota intestinal na prevenção da patologia, o que tem levado a formação dos bancos de leite materno, utilização de prebióticos, probióticos e finalmente, a nível experimental, transplante de microbiota fecal (TMF) (Li X et al., 2017; Prado et al., 2019).

1.1 QUADRO CLÍNICO DA ENTEROCOLITE NECROSANTE

Os pacientes apresentam, no início do quadro clínico, sintomatologia compatível com sepse no RN, com suas respectivas alterações clínicas e laboratoriais, como por exemplo: letargia, instabilidade térmica, vômitos ou resíduo gástrico bilioso, apnéia, bradicardia, hipoglicemia, choque, leucopenia, trombocitopenia e acidose metabólica progressiva (de Souza, 2008; Coran, 2012; Benkoe et al., 2014a; Rich et al., 2017). A medida que a doença progride, sinais e sintomas clínicos são direcionados para o quadro abdominal, com o paciente podendo apresentar enterorragia, distensão abdominal, massas palpáveis e eritema de parede abdominal (de Souza, 2008; Coran, 2012). Radiologicamente, a presença de pneumatose intestinal confirma a patologia, ela representa a presença de pequenas bolhas de gás na parede

intestinal, a qual correspondem a hidrogênio, subproduto do metabolismo bacteriano (Rich et al., 2017; van Druten et al., 2019). A pneumatose intestinal pode estar ausente no início do quadro clínico, ocorrendo apenas imagens da distensão de alças intestinais, mas sua presença confirma o diagnóstico de ECN (de Souza, 2008; Coran, 2012; Benkoe et al., 2014a; van Druten et al., 2019).

O tratamento da doença demanda deixar o paciente em jejum, administração de antibioticoterapia de amplo espectro e suporte avançado de vida, com uso de nutrição parenteral, vasopressores e ventilação mecânica (de Souza, 2008; Coran, 2012; Besner, 2014; Rich et al., 2017). Caso a patologia desenvolva lesão transmural, a mesma vai se manifestar por pneumoperitônio, que é a presença de ar e gases intestinais dentro da cavidade peritoneal, ou pela presença de coleções líquidas com grumos (van Druten et al., 2019). Quando há a presença de pneumoperitônio, a intervenção cirúrgica é obrigatória, com ressecção do intestino acometido e a criação de ostomias (Coran, 2012; Rich et al., 2017; Dukleska et al., 2019). A porção de intestino acometido pode ser limitada, frequentemente o íleo, quando é considerada focal, podendo evoluir para panenterocolite, quando atinge mais de 75% do intestino delgado e cólon (Dukleska et al., 2019). Os casos em que a ressecção envolve 50% ou mais do intestino delgado, levam a síndrome do intestino encurtado, com necessidade de complementação nutricional parenteral por meses, anos ou até definitivamente (Coran, 2012; Hogberg et al., 2013; Besner, 2014; Dukleska et al., 2019). É uma doença que possui nas melhores das hipóteses uma sobrevida de 70% naqueles com pneumatose intestinal, enquanto nos que foram submetidos a ressecção cirúrgica do intestino acometido, ao redor de 50% (de Souza, 2008; Mollen et al., 2008; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013; Besner, 2014; Rich et al., 2017).

1.2 LESÃO DA BARREIRA MUCOSA INTESTINAL

O período neonatal é caracterizado por importante susceptibilidade a infecções e uma resposta inflamatória exagerada (Rentea et al., 2013; Yu et al., 2015). Além da prematuridade, encontram-se reconhecidos universalmente três fatores para o desenvolvimento da doença: episódios de isquemia-reperfusão devido a instabilidade hemodinâmica do RN, colonização bacteriana e exposição a fórmulas artificiais (de Souza, 2008). Apesar disso, a maioria dos RN com um ou até os três fatores não desenvolvem a doença, demonstrando que a etiologia é bastante complexa (de Souza, 2008). Os dados empíricos e experimentais até o momento sugerem que a ECN ocorre em neonato prematuro vulnerável, o qual sofreu insulto e invasão

bacteriana no trato gastrointestinal imaturo, onde a função de barreira mucosa e a imunomodulação estão alteradas (Coran, 2012).

A barreira mucosa intestinal é formada pelo epitélio intestinal, o qual constitui uma barreira dinâmica ao transporte de microbianos e antígenos. Suas junções de oclusão, impedindo a passagem de bactérias são reguladas por vários genes como as claudinas, e de *gap junction protein* (Rentea et al., 2012; Hogberg et al., 2013). Possuem seu próprio mecanismo de reparo e regeneração intestinal, realizados através da migração de enterócitos viáveis, e após, pela proliferação e diferenciação intestinal (de Souza, 2008). Na ECN, histologicamente, ocorre necrose de coagulação ou isquêmica, correspondendo a necrose tecidual com perda celular, com preservação "fantasma" da estrutura celular e tecidual. As vilosidades mantem o tecido, ainda que acelulares. Identifica-se também no tecido ulceração, inflamação, hemorragias, alterações regenerativas (regeneração epitelial, tecido de granulação e fibrose), presença de bactérias no lúmen e na parede intestinal, pneumatose intestinal (submucosa e/ou serosa), edema submucoso, abscesso de criptas, pseudomembranas e hipercrecimento fúngico (de Souza, 2008; Coran, 2012).

As glândulas exócrinas na superfície da mucosa intestinal secretam proteínas que realizam funções protetoras na ausência de anticorpos específicos, como lactoferrinas, lisozimas, peróxidos, angiogeninas, peptídeos trefoil, defensinas, fosfatase alcalina intestinal, creptinas e IgA polimérica (Rentea et al., 2012; Rentea et al., 2013; Heinzerling et al., 2014). No lúmen intestinal, o próprio peristaltismo, acrescido das secreções gástricas e pancreatobiliares, além do muco intestinal, rico em imunoglobulinas, diminuem o número de microorganismos viáveis e de antígenos (Perrone et al., 2010; Coran, 2012).

O trato gastrointestinal no prematuro é caracterizado por imaturidade celular e humoral, com permeabilidade aumentada, função de barreira intestinal imatura, inervação incompleta com motilidade diminuída, diminuição das secreções gástricas, associado a redução na concentração de enzimas proteolíticas (Coran, 2012; Besner, 2014). Aparentemente o comprometimento da barreira mucosa intestinal é o primeiro evento que leva a ativação da cascata inflamatória na ECN (Besner, 2014). Esse comprometimento pode ser iniciado por estressores fisiológicos perinatais, os quais primariamente ou secundariamente causam isquemia intestinal, devido a episódios de hipóxia, hipotensão e hipotermia (Coran, 2012). Durante a reperfusão, o oxigênio molecular é reintroduzido no tecido, onde reage com hipoxantina e xantina oxidase, produzindo espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Essas espécies reativas de oxigênio vão causar lesões nas membranas celulares e mitocondriais, as

quais vão provocar áreas desnudadas de epitélio nas extremidades apicais das vilosidades, onde as bactérias podem atravessar a barreira mucosa (Besner, 2014).

Outro mecanismo de lesão por radicais livres na barreira mucosa intestinal envolve o óxido nítrico (ON), uma espécie reativa de nitrogênio, produzido pela sintetase de ON (ONS), a qual catalisa a oxidação do aminoácido L-arginina, liberando citrulina e ON. Existem 3 isoformas da sintetase do óxido nítrico: neuronal (nONS), endotelial (eONS), e a forma induzível (iONS). Enquanto as primeiras são reguladas pelo fluxo de cálcio intracelular, a última é induzida por citocinas, fatores de crescimento e inflamação (de Souza, 2008). A expressão e atividade do iONS normalmente são baixas, mas podem aumentar até 15 vezes quando estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), causando a liberação de altos níveis de ON (Feng et al., 2006). O LPS constitui parte da membrana celular das bactérias Gram-negativas. O neonato apresenta resposta exagerada e sustentada na produção de iONS secundária a ENC (Feng et al., 2006). O ON pode lesar a barreira mucosa diretamente, por apoptose de enterócitos e pela inibição do reparo celular. Embora o ON tenha vida curta, sua principal reação biológica deletéria está relacionada a criação do peroxinitrito (ONOO^-), fruto de sua combinação com o superóxido gerado nos locais inflamatórios. O peroxinitrito é um potente oxidante com potencial de peroxidação lipídica e lesão de membranas celulares. A hiperexpressão sustentada de ON e provavelmente de ONOO^- , atuam na morte celular diretamente pela interrupção da função mitocondrial e inibição da respiração celular. O ONOO^- pode induzir apoptose acelerada nas vilosidades intestinais e impedir a cicatrização da mucosa, tanto inibindo a migração quanto a proliferação dos enterócitos, bem como interrompendo a cascata de sinalização dos mecanismos de reparo tecidual (Feng et al., 2006; Coran, 2012; Li et al., 2017).

Os mediadores inflamatórios têm um papel crítico no desenvolvimento de ECN, aumentando a permeabilidade da membrana intestinal, permitindo a translocação de bactérias e toxinas, levando ao colapso da integridade da mucosa intestinal (Coran, 2012). A ruptura da barreira epitelial resulta primariamente de apoptose, iniciada por citocinas, toxinas e produtos bacterianos (Bergholz et al., 2013). Vários mediadores inflamatórios demonstraram, em estudos experimentais, causar apoptose, como ON, LPS, $\text{TNF-}\alpha$, e fator de ativação plaquetária (FAP) (Coran, 2012; Maretta et al., 2014; Zhou et al., 2014). A administração de fatores de crescimento, especificamente, fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento epidérmico ligante a heparina (HB-EGF), bem como utilização de inibidores de pan-caspases, demonstraram forte efeito terapêutico em modelos experimentais, inibindo a apoptose (Feng et al., 2006; Feng et al., 2007; Radulescu et al., 2010a; Radulescu et al., 2010b; Coran 2012; Besner 2014;).

A ciclooxigenase 2 (COX-2) é a enzima que catalisa o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano. Normalmente é indetectável na maioria dos tecidos, a não ser quando em processos inflamatórios intestinais, como a ECN (de Souza, 2008). A expressão de COX-2 é aumentada pelas citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). De outra forma é inibida pela interleucina 10 (IL10), citocina de múltiplas propriedades anti-inflamatórias (Strati 2021). A IL-10 é produzida por muitas células imunes, incluindo células T CD4+ e CD8+, células dendríticas residentes (CD), neutrófilos, células NK (do inglês *natural killer*), eosinófilos e células linfóides inatas. As células derivadas das TCD4+ (Tregs, do inglês *T regulatory cells*), células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*), e células B regulatórias são relevantes para homeostase da mucosa intestinal e na produção de IL-10 para prevenção da enterocolite mediada pelas células T (Mishima et al., 2019). A expressão de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e COX-2 são utilizadas como marcadores da intensidade da lesão na ECN (de Souza, 2008; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013; Rentea et al., 2013; Benkoe et al., 2014 a; Benkoe et al., 2014 b; Goldstein et al., 2019).

1.3 MICROBIOTA

Quando agentes infecciosos entram em contato com a barreira mucosa intestinal, e eventualmente a ultrapassam, acabam entrando em contato com a população de células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas residentes (Janeway et al., 2002). A interação dessas células com os agentes infecciosos ocorre por intermédio dos receptores de reconhecimentos de padrão (PPR) que, por sua vez, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Janeway et al., 2002; Coran, 2012). Os PAMPs são estruturas conservadas evolutivamente e essenciais para sobrevivência dos microorganismos. Como exemplo a flagelina (componente do flagelo bacteriano), LPS, zimosan (componente da parede celular de fungos), dsRNA (RNA dupla fita, comum em alguns vírus), entre outros (Janeway et al., 2002). Quando ocorre a interação PAMPs-PPR, ocorre a liberação de sinais celulares que culminam na indução da transcrição de genes importantes para ativação celular e resposta inflamatória (Janeway et al, 2002). Diferentes PPRs são expressos numa mesma célula, o que faz com que esta tenha a capacidade de reconhecer várias classes de microorganismos. Entre os RRP, os que estão envolvidos diretamente com a ECN são os receptores toll-like (TLR) (de Souza, 2008; Mollen et al., 2008; Coran, 2012). Os receptores toll-like são expressos nas células epiteliais, possuindo um papel importante na defesa da

mucosa, dentre estes, o TLR4 foi o primeiro identificado. Os LPS constituem parte da membrana celular de todas as bactérias Gram-negativas, o contato do LPS com TLR4, desencadeia resposta inflamatória e imunológica (Tatum et al., 2010; Zhou et al., 2014). Os correceptores CD14 e MD2 possuem um papel importante na apresentação e sinalização do LPS, ratos *knockout* para TLR4 são aparentemente protegidos de desenvolver ECN (Mollen et al., 2008).

Os TLR iniciam uma cascata intracelular de sinalização, levando à degradação do inibidor de IKB, translocação do fator nuclear kB (NF-kB) e ativação transcricional de genes de resposta pró-inflamatória (de Souza, 2008; Mollen et al., 2008, Strati 2021). O NF-kB é um fator de transcrição com papel chave na regulamentação de vários genes pró-inflamatórios nos enterócitos. Sua ativação é regulada negativamente pelo IKB, que o retém no citoplasma, prevenindo a transcrição nuclear. Nos recém-nascidos prematuros se encontra uma expressão reduzida de IKB, como resultado, suas células epiteliais podem apresentar inflamação excessiva quando a rota TLR é ativada por bactérias patogênicas (de Souza, 2008). A estimulação da célula por citocinas, endotoxinas e produtos bacterianos, leva a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os quais vão ativar a IKB quinase. Essa quinase ao fosforilar a IKB, libera o NF-kB para o núcleo, onde o mesmo ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios, demonstrando um processo de retroalimentação que potencializa a lesão celular (de Souza, 2008; Sharif et al., 2020). Esses genes vão provocar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α . As células B regulatórias no intestino reconhecem o polissacarídeo A do *Bacteroides fragylis* através dos receptores TLR-2 e Myd88, ativando a rota PI3K/AKT e GSK3 β , levando a transcrição de IL-10 (Mishima et al., 2019). O TLR-5 reconhece a flagelina e também recruta o MyD88 ativando as IKB quinases (Mishima et al., 2019).

O feto não reside em um ambiente intrauterino estéril, ele é exposto a bactérias comensais provindas do intestino materno, presentes na corrente sanguínea, que atravessam a placenta e entram no líquido amniótico (Walker 2017). Ao nascimento, os microorganismos do ambiente, do parto e do leite materno vão formar sua microbiota, que é composta de bactérias Gram-positivas e anaeróbios não formadores de esporos (*Bifidobactérias*, *Lactobacilos* e *Bacteroides fragylis*) nas primeiras duas semanas de vida (de Souza, 2008; Feng et al., 2007; Walker 2017; Adelman et al., 2020). A diversidade bacteriana e a colonização por anaeróbios no intestino protegem o neonato contra sepse e translocação por espécies de *Staphylococcus* e *Escherichia coli* (Adelman et al., 2020).

Embora os estudos estejam mais focados em bactérias, os vírus, fungos, arqueias e bacteriófagos fazem parte da microbiota intestinal (Mullish et al., 2019; Keskey et al., 2020).

É estimado que o intestino humano possua quantidade semelhante de bacteriófagos e bactérias, cerca de 10^{14} (Mullish et al., 2019), e esses contribuem para o equilíbrio ecológico da microbiota (Rasmussen et al., 2020). Essa microbiota por sua vez, ao interagir com os receptores TLR, vai permitir que a célula desenvolva tolerância, trazendo o equilíbrio entre os estímulos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (Berrington et al., 2014; Walker 2017). A imunidade adaptativa requer um balanço entre as células TCD4+, as células *T-helper*, que são mediadoras da imunidade humoral, celular e a tolerância (Walker 2017). Essas células se diferenciam devido a estímulos externos, em TH-1 produtora de citocinas de defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, TH-2 que está relacionada a reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos, TH-17 relacionada a defesa contra bactérias e fungos, e por Tregs, que são relacionadas a tolerância imunológica (Walker 2017). Os neonatos à termo nascem com predomínio de TH-2 para protegê-lo da rejeição no útero, com a colonização há um balanço entre a resposta da TH-1, TH-2, TH-17 e Tregs (Walker 2017).

A microbiota intestinal protege o hospedeiro através de múltiplos mecanismos, influenciando na expressão de mucina, na produção de ácidos graxos de cadeia curta, na permeabilidade da mucosa, na secreção de IgA, na produção de peptídeos antibacterianos, bem como, na expressão de citocinas pela mucosa intestinal (Wang et al., 2009; Burke et al., 2013; Berrington et al., 2014; Keskey et al., 2020).

Nenhum organismo isoladamente foi implicado como o causador da ECN, e acredita-se que uma colonização anormal do trato gastrointestinal pode ter um papel fundamental no seu desenvolvimento. Desregulação deste sistema, chamada de disbiose, devido ao ambiente da UTI com predomínio de bactérias patogênicas, fórmulas alimentares artificiais, uso de antibióticos, opióides e nutrição parenteral, está relacionada ao desenvolvimento de ECN (Wang et al., 2009; Burke et al., 2013; Torazza et al., 2013; Berrington et al., 2014; Patole et al., 2014; Adelman et al., 2020; Strati 2021). Membros das famílias das enterobactérias (principalmente *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia*), clostrídios, enterococos e estafilococos coagulase-negativos têm sido associados a doença. Em alguns estudos são demonstrados o predomínio de *Clostridium* e *Klebsiella* (Tatum et al., 2010; Torazza et al., 2013; Patole et al., 2014; Sim et al., 2014). Em epidemias em UTI neonatais, os germes mais prevalentes costumam ser: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, espécies de *Clostridium* e de *Salmonella* (Bjorkstrom et al., 2009). Recentemente tem se observado que há uma mudança no padrão de colonização intestinal que precede o quadro clínico de ECN, sem modificar a quantidade total de bactérias, com predomínio de proteobactérias (*E.coli*) e actinobactérias (Bifidobactérias), com diminuição de sua diversidade, de uma a duas semanas antes do início do quadro clínico (Torraza et al., 2013; Jenke et al., 2013; Patole et al., 2014;

Liu et al., 2020). Em estudo prospectivo sobre o desenvolvimento da microbiota de gêmeos, apesar de identificarem apenas um caso de ECN comparando com o gêmeo sadio, identificou também uma mudança no padrão microbiano, com redução da diversidade e predominância de *Escherichia sp* (Stewart et al., 2013).

A microbiota intestinal é possivelmente o componente menos compreendido da fisiologia humana, a despeito do crescimento exponencial em publicações sobre o assunto (Torrazza et al., 2013). O intestino humano é colonizado por cerca de 100 trilhões de bactérias, classificadas em cerca de 200 a 1000 espécies (Berrington et al., 2014). Sua complexidade começou a ser melhor elucidada a partir da evolução técnica no reconhecimento de microorganismos, não identificadas pelos meios de cultura tradicionais, através de metodologias de sequenciamento de ácidos nucleicos (Torrazza et al., 2013). Estas metodologias também trazem desafios relacionados a padronização na coleta de amostra, sequenciamento, bancos de referência de bioespécimes, ainda mais por envolverem outros componentes da microbiota, além de bactérias, como bacteriófagos, vírus e fungos (Torrazza et al., 2013). À medida que há um aumento em informação sobre estes componentes da microbiota, mais difícil se torna a dualização entre comensais e patogênicos, principalmente em se tratando de doenças relacionadas aos mesmos (Belizario et al., 2017). A disbiose, como um estado anormal da microbiota, pode estar associada ao prognóstico ou severidade de uma doença ou estado, sem, contudo, estar tão clara a relação entre causa e efeito (He et al., 2015; Kellermayer et al., 2019). Ela pode ser primária, como na colite pseudomembranosa, má nutrição, colonização por *enterococcus* resistente a vancomicina, ou secundária, como quando decorrente de quimioterapia, HIV, obesidade, doença intestinal inflamatória crônica, etc. Essa divisão é arbitrária e novamente é difícil caracterizar causa e efeito visto que a atuação da microbiota envolve aspectos relacionados ao ambiente e a ao próprio hospedeiro, onde fatores genéticos e epigenéticos devem ser avaliados (Berrington et al., 2014; Kellermayer et al., 2019).

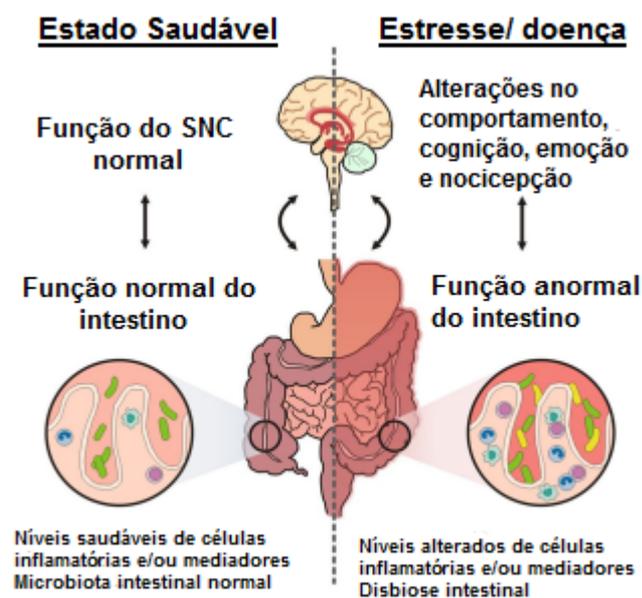
1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DO EIXO INTESTINO-CÉREBRO

Estudos revelam como variações e mudanças na composição da microbiota intestinal influenciam a fisiologia normal e contribuem para doenças que vão da inflamação a obesidade (Cryan e Dinan, 2012). Há evidências que a microbiota intestinal também se comunica com o sistema nervoso central (SNC) e essa interação possivelmente ocorre através de vias neurais, endócrinas e imunes (Cryan e Dinan, 2012). Atualmente está claro que alterações nas

interações intestino-cérebro estão associadas a inflamação intestinal, síndromes crônicas de dor abdominal, como a síndrome do intestino irritável, além de transtornos alimentares (Mayer, 2011), e que a modulação da função do eixo intestino-cérebro está associada a alterações na resposta ao estresse e comportamento (Rhee et al., 2009, Niemarkt et al., 2019). Crucialmente, há uma crescente apreciação de que essa comunicação funciona bidirecionalmente: a microbiota influencia a função do SNC, e o SNC influencia a composição da microbiota através de seus efeitos no TGI (Yarandi, et al., 2016).

Recentes visões neurobiológicas sobre essa relação (intestino e microbiota *versus* cérebro) revelaram um sistema de comunicação bidirecional complexo que não apenas assegura a manutenção adequada da homeostase e digestão gastrointestinal, mas também tem múltiplos efeitos sobre afeto, motivação e funções cognitivas superiores, incluindo a tomada de decisão intuitiva (Mayer, 2011) Figura 1.

Figura 1: Impacto da microbiota intestinal através do eixo intestino-cerebral em estados saudáveis e de doença ou estresse.



Fonte: Adaptada de Grenham et al., 2011.

O impacto recíproco do chamado eixo intestino-cérebro, ou eixo cérebro-intestino tem sido reconhecido desde meados do século XIX, porém somente anos depois que surgiu o conceito do eixo microbiota-intestino-cérebro como uma extensão do conceito anteriormente apresentado, com a intenção de salientar o papel da microbiota intestinal nesta comunicação, embora ambos os termos sejam utilizados de igual forma (Stilling et al., 2014).

Os avanços nas tecnologias de sequenciamento e nas ferramentas bioinformáticas para estudar a microbiota intestinal contribuíram para uma maior apreciação de sua diversidade, plasticidade e papel primordial em diversas funções fisiológicas. Além de preservar a integridade da barreira intestinal-epitelial ao longo do TGI, as bactérias intestinais são críticas para o desenvolvimento e a maturação do sistema imunológico inato e adaptativo do hospedeiro, absorção de nutrientes, metabolismo e proteção contra invasores estrangeiros (Hooper et al., 2001; Bäckhed et al., 2004; Geuking et al., 2011; Round et al., 2011). De fato, as funções da microbiota intestinal se estendem além das fronteiras físicas do trato digestivo em que residem. O repertório diversificado de metabólitos e moléculas de sinalização produzidas por bactérias intestinais entra na circulação sistêmica, facilitando a interferência molecular entre hospedeiro e micróbios em todo o corpo (Martinez et al., 2017; Hudson et al., 2017).

A comunicação entre micróbios intestinais e o SNC é mediada por uma combinação de vias imunológicas, entéricas e neurais que fornecem conexões físicas e químicas entre o SNC e a periferia, e vários paradigmas experimentais foram usados para demonstrar que os micróbios intestinais influenciam muitas facetas na fisiologia do SNC (Mayer et al., 2015; Fung et al., 2017; Yoo e Mazmanian, 2017). Camundongos livres de germes (*Germ Free* [GF]; ou seja, sem todos os micróbios comensais e patogênicos), antibióticos, TMF e pré/probióticos demonstraram um papel das bactérias intestinais na sinalização de neurotransmissores, plasticidade sináptica, mielinização e neurogênese (Diaz Heijtz et al., 2011; Neufeld et al., 2011; Ogbonnaya et al., 2015; Hoban et al., 2016; Niemarkt et al., 2019). Além disso, a ausência de micróbios intestinais causa déficits na cognição e na interação social, apoiando ainda mais o papel dos micróbios intestinais no funcionamento cerebral de ordem superior (Neufeld et al., 2011; Luczynski et al., 2016).

A microbiota intestinal afeta várias células no SNC, incluindo a microglia. De fato, estudos recentes demonstraram que a microglia é sensível a fatores produzidos pela microbiota intestinal. Observaram-se diferenças marcantes na estrutura e função da microglia derivada de camundongos livres de patógenos específicos (SPF) e GF, tanto no nível genético quanto no morfológico (Erny et al., 2015). Desde então, novos trabalhos definiram fatores e caminhos adicionais pelos quais os micróbios intestinais influenciam a maturação e a função microgliais no SNC.

Microglia são macrófagos residentes em tecidos que compõem de 5 a 15% do total de células cerebrais e têm várias funções bem definidas no SNC (Pelvig et al., 2008). Durante o desenvolvimento inicial, a microglia regula ativamente os números de células neuronais e o refinamento sináptico, moldando finalmente o circuito neural (Sierra et al., 2010; Paolicelli et

al., 2011; Wynn et al., 2013). Ao detectar sinais de infecção ou lesão, a microglia passa de um estado de vigilância homeostática para um estado ativado, facilitando programas de reparo antimicrobiano ou tecidual que restauram a homeostase (Saijo e Glass, 2011).

Além de papéis importantes no desenvolvimento cerebral e na homeostase, estudos genéticos recentes fornecem evidências de que a microglia contribui para a patogênese de vários distúrbios neurodegenerativos e do desenvolvimento neurológico (Salter e Stevens, 2017). No SNC, a atividade microglial é governada em parte por citocinas e quimiocinas, neurotransmissores e outras moléculas que regulam as vias de sinalização que influenciam várias funções cerebrais (Xavier et al., 2014). Considerada uma vez protegida do sistema circulatório pela barreira hematoencefálica (BBB), sabe-se que a atividade microglial é influenciada por fatores originados fora do SNC, incluindo o intestino. A interação entre o SNC e a microbiota intestinal (conhecido como eixo intestino-cérebro) é crítica para várias facetas da fisiologia do SNC, incluindo desenvolvimento e função microgliais (Mayer et al., 2015; Fung et al., 2017). Estudos recentes fornecem informações importantes sobre o papel da microbiota intestinal na maturação, identidade e função microgliais, tanto em condições de estado estacionário quanto em doenças associadas à ativação microglial elevada.

O recente aumento da pesquisa em comunicação intestino-cérebro criou uma nova narrativa sobre como a microbiota pode moldar a identidade e função microglial e como pode modular a patogênese de doenças neurológicas. Assim, a compreensão do eixo intestino-cérebro fornecerá a base para novas abordagens terapêuticas em potencial nos próximos anos.

1.5 MECANISMO DE LESÃO DO SNC NA ECN

A ECN é importante causa de morte e incapacidade em neonatos, onde cerca de metade dos sobreviventes sofrerá de deficiências neurológicas profundas, mais significativas e difíceis de tratar do que nos prematuros que não desenvolveram a doença (Lee et al., 2014; Rich et al., 2017; Niemarkt et al., 2019). Os pacientes evoluem com menores índices em escores de desenvolvimento mental e psicomotor, tendo maior risco de paralisia cerebral, doenças visuais, microcefalia e comprometimento cognitivo permanente (Rich et al., 2017; Hickey et al., 2018; Niemarkt et al., 2019). A lesão cerebral associada a ECN é caracterizada por desmielinização e redução no volume do órgão, onde a ativação microglial e lesão das células progenitoras de oligodendrócitos (CPO) parecem ser os eventos desencadeantes (Lee et al., 2014; Shin et al., 2016).

Em modelos experimentais da doença, o TLR4 na micróglia leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), perda de CPOs e lesão da barreira

hematoencefálica (Hickey et al., 2018; Niño et al., 2018; Biouss et al., 2019; Niemarkt et al., 2019). Tal liberação e indução da micróglia não ocorreu quando o espécime foi submetido a hipóxia isoladamente, demonstrando a importância da lesão da barreira intestinal no processo (Niño et al., 2018). O mecanismo de ativação do TLR4 mais significativo nesses modelos foi pela liberação pela mucosa intestinal do ligante HMGB1, do inglês *high-mobility group box 1*, após indução de enterocolite. Animais geneticamente modificados, com ausência do TLR4 na micróglia, ou HMGB1 na mucosa intestinal, não apresentam ativação da micróglia quando submetido à indução de ENC, bem como não tiveram perda de CPOs e desmielinização (Niño et al., 2018; Biouss et al., 2019). A disbiose intensifica a inflamação sistêmica, diminui a função da barreira hemato-encefálica através dos ácidos graxos de cadeia curta (small chain fatty acids- SCFA), e induz a produção de neurotransmissores pelas células intestinais, como serotonina, melatonina, GABA e dopamina (Niemarkt et al., 2019).

1.6 TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL

O leite materno é reconhecido universalmente como um fator de proteção para a ECN. Apresenta uma fórmula osmolarmente mais adequada ao RN, a qual permite o desenvolvimento de comensais microbianos, trazendo várias substâncias protetoras como imunoglobulinas e relaxinas (de Souza, 2008; Matheson et al., 2014; Patole et al., 2014). Vários experimentos e técnicas para induzir ECN em modelos animais, exploram a utilização de fórmulas artificiais como agentes causadores da mesma (Feng et al., 2006; Radulescu et al., 2010a; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013;). Identificando o papel de bactérias patogênicas na ECN, e os papéis protetores do leite materno, uma alternativa de tratamento seria estimular a colonização intestinal, em RNs em uso de fórmulas artificiais, com probióticos. Probióticos são microorganismos vivos, não patogênicos, que colonizam o intestino e conferem benefícios ao hospedeiro. Eles atuam no intestino promovendo imunomodulação, contribuem nutricionalmente, impactam positivamente na função motora intestinal e na resistência a bactérias patogênicas (Berrington et al., 2014; Zeng et al., 2019). Muitos estudos têm comprovado o benefício da utilização de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e *Sacharomyces*, além do *Streptococcus thermophilus*, na prevenção de ECN (Berrington et al., 2014; Dasopoulou et al., 2015). Já a Cochrane Review (2020) concluiu que não houve evidência de uma redução significativa da ECN, sepse ou comprometimento neurológico nos estudos incluídos na revisão (Sharif et al., 2020).

O TMF, estratégia na qual é realizada a transferência de matéria fecal de pacientes saudáveis para pacientes com disbiose, com intuito de equilibrar essa flora, vem sendo utilizado

como tratamento da colite pseudomembranosa recorrente, doença causada pelo *Clostridium difficile* (Hudson et al., 2017; Burke et al., 2013; Burrello et al., 2018; Zeng et al., 2019). Ela ocorre secundariamente ao uso de antibióticos de largo espectro, como clindamicina, cefalosporinas, aminopenicilinas e fluorquinolonas. Estes antibióticos depletam os dois filos dominantes do intestino, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, aumentando as proteobactérias, o que leva a infecção pelo *Clostridium difficile* a produção de suas toxinas (Hudson et al., 2017). Para o tratamento da doença são utilizados metronidazol ou vancomicina, sendo a última mais efetiva (Hudson et al., 2017). A recorrência é comum, chegando a 40% em 1 episódio e 60% após a primeira recorrência, em parte, devido aos antibióticos utilizados no tratamento, também depletarem os *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Hudson et al., 2017).

No tratamento desta patologia o TMF demonstrou eficácia similar a vancomicina e eventualmente superior em vários ensaios clínicos randomizados, onde a cura chegou a 94% dos pacientes (Burke et al., 2013; Strati 2021). O TMF vem sendo estudado em múltiplas doenças, desde doenças inflamatórias ou de motilidade intestinal (Berg et al., 2015), obesidade (Jayasinghe et al., 2016), sepse (Keskey et al., 2020; Adelman et al., 2020), esteatose hepática não alcóolica (Konturek et al., 2015), diabetes tipo 2 (He et al., 2015), e ECN (Li X et al., 2017; Prado et al., 2019). As modificações na microbiota propostos pelo transplante não são permanentes se não houver ambiente e interações com hospedeiro que as perpetuem, neste contexto o TMF pode ter papel adjuvante nas propostas terapêuticas em estudo para estas patologias (He et al., 2015). O TMF aumenta a diversidade microbiana no intestino, melhorando o balanço ecológico e reconstruindo a função do sistema imune (Hudson et al., 2017; Zeng et al., 2019). A flora intestinal do doador mantém a integridade da barreira mucosa, limita a permeabilidade, e inibe a apoptose, por competição com as bactérias patogênicas, aumento da produção de IgA, mucina e bacteriocinas. A flora do doador também pode promover a síntese de citocinas anti-inflamatórias, restaurar o metabolismo dos ácidos biliares, e contribuir para maturação do sistema imune, entre outros mecanismos (Hudson et al., 2017; Zeng et al., 2019).

O TMF embora já reconhecido como segunda linha de tratamento para infecção recorrente pelo *Clostridium difficile* (irCD) ainda carece de padronização na realização do mesmo (Burke et al, 2013; Berg et al., 2015; He et al 2015; Konturek et al., 2015). Existem variações nos ensaios clínicos em relação a doadores, preparação e modo de administração. Nos estudos em seres humanos, usualmente de 8 a 600g de fezes são filtradas em igual quantidade de soro fisiológico, e o conteúdo diluído é administrado por sonda nasogástrica ou endoscopia (Burke et al, 2013; Berg et al., 2015; He et al 2015; Konturek et al., 2015). A maioria dos pesquisadores acredita que 10 a 100g são suficientes (Konturek et al., 2015). A

utilização de fezes congeladas ou frescas, em meio aeróbio ou anaeróbio, liofilizadas, em cápsulas, administradas por enema, colonoscopia ou por SNG, não tem demonstrado afetar o resultado (Seekatz et al., 2015; Konturek et al., 2015). Conforme a indicação e a forma de administração, o receptor do transplante é submetido previamente ao uso de antibióticos, inibidores da bomba de prótons, ou enemas, embora não esteja claro ainda a importância e o impacto deste preparo (Hudson et al., 2017; Nicholson et al., 2019). Variação de gênero e idade entre receptores e doadores raramente tem demonstrado influenciar o resultado do TMF no tratamento da IrCD, ainda que algumas diferenças tenham sido demonstrado em coortes com número pequeno de participantes (Belizario., 2017). Em estudo retrospectivo em pacientes pediátricos com 335 crianças, medicações ou patologias de base, não interferiram no resultado do TMF para irCD (Bhaskar Gurram, 2019).

O TMF ainda é considerado uma terapia em investigação pelo FDA (*United States Food and Drug Administration*), com relatos de infecções bacterianas severas e mortes devido ao transplante (Rasmussen et al., 2020). Devido a complexidade e necessidade de exames do doador, muitas vezes membros da família ou amigos, foram criados bancos de fezes (Belizario et al., 2017; Rasmussen et al., 2020). Aparentemente existem doadores cuja composição da microbiota parece ser mais saudável e mais efetiva, conhecidos como “superdoadores”, que apresentam uma proporção maior de *Bacteroides* e menor de *Streptococcus*, devido a genética e uma alimentação mais saudável (Hudson et al., 2017). Em modelos experimentais, os TMF com maior proporção de *Bacteroides* e menos *Streptococcus* parecem ter melhores efeitos no tratamento da inflamação intestinal (Konturek et al., 2015; Hudson et al., 2017) Em relação ao número de administrações, os estudos tem demonstrado que um ou poucos TMF apresentam resultados por até dois meses (Nicholson et al., 2019). Estudos de sequenciamento de DNA, comparando a população bacteriana nas fezes antes e depois do TMF, demonstraram que dentro dos primeiros três dias já ocorre a consolidação do enxerto, e isso é acompanhado da resolução dos sintomas nos pacientes com irCD (Seekatz et al., 2015; Strati 2021). Surpreendentemente, mesmo quando a mudança de padrão microbiano não corresponde a do doador, aparentemente o efeito é mantido (Khoruts et al., 2016), e em estudos de auto - TMF em pacientes com IrCD, o tratamento foi capaz de curar 60% dos sujeitos da pesquisa (Ott et al., 2017). Esses dados reforçam o papel de outros componentes da microbiota e mesmo das fezes na resolução dos sintomas.

Pensando na importância da microbiota na barreira mucosa, é possível que esta técnica seja útil na prevenção da enterocolite necrosante em neonatos (Berrington et al., 2014). Foi demonstrado em modelo experimental que o TMF foi capaz modificar a microbiota do receptor, de reduzir a lesão por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como na

produção de citocinas pró-inflamatórias e na lesão histológica (Li X et al., 2017; Prado et al., 2019). Em outro experimento comparando o TMF via gavagem e por enema na prevenção de NEC em camundongos, demonstrou que a administração por enema foi mais efetivo em diminuir a expressão de IL-6 e TNF- α , a lesão histológica e no aumento da expressão de Claudina-7, marcador de integridade da barreira mucosa (Liu et al., 2020). Contudo, é fato que são grandes as dificuldades em translacionar esse estudo, no que urge compararmos a eficácia com probióticos e principalmente, encontrar uma forma mais segura de utilizá-lo.

O TMF tem demonstrado eficácia em múltiplas formas de composição e administração. Imagina-se que a quantidade de bactérias varie significativamente em cada uma, e que outros componentes das fezes, como debris bacterianos, proteínas, compostos antimicrobianos, produtos do metabolismo, oligonucleotídeos, e nanopartículas, possuam papel ativo nesta terapia. Dessa forma, a hipótese em estudo é de que poderíamos prescindir da microbiota viva, e utilizar as fezes esterilizadas como prevenção da ECN. Inclusive comparar com o uso de probióticos, os únicos microorganismos permitidos para prevenção de ECN em neonatos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o efeito do TMF e transplante de fezes esterilizadas em relação a resposta inflamatória, estresse oxidativo e lesão tecidual em modelo de simulação de ECN, bem como se é mais efetivo que o uso de probióticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Padronizar protocolo de esterilização de fezes;

- Comparar o efeito do TMF fresco, fezes esterilizadas e uso de probióticos em animais submetidos a ECN;

-Caracterizar a resposta inflamatória aguda em soro, intestino e cérebro de animais submetidos a ECN e tratados com TMF fresco, estéril e probióticos.

-Quantificar a presença de dano oxidativo 72h horas após indução da ECN em soro, intestino e cérebro de animais tratados com TMF fresco, estéril e probióticos.

-Avaliar lesão tecidual na mucosa intestinal em animais submetidos a ECN e tratados com TMF fresco, estéril e probióticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS – ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos de 1 dia de vida fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade do ar controlada. A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade sob número 68/2020 e os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos prévios (Besner et al., 2006), para uma diferença de até 30% nos parâmetros a serem analisados, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. Desta forma foram 4 grupos de 20 animais para as intervenções e um grupo de 10 animais que foi o controle, totalizando 90 animais, e mais 1 animal adulto jovem que foi o doador de material fecal para o experimento.

3.2 INDUÇÃO DE ECN E TRATAMENTOS

Para este estudo foram utilizados 90 ratos recém-nascidos da linhagem *Wistar*. Destes 90 animais, 80 foram separados de suas progenitoras após o nascimento e outros 10 foram amamentados naturalmente e mantidos com a mãe. Esse grupo de 10 animais foi considerado o grupo controle. Os outros 80 ratos foram submetidos a sepse e lesão intestinal. Sepse foi induzida pela administração de LPS (2mg/kg) via oral por gavagem, uma única vez, no segundo dia de vida. Os animais então foram submetidos a ambiente de hipóxia em câmara de *plexiglass* infundida com nitrogênio 100% por 60 segundos, após foram expostos ao frio a (4°C) por 10 minutos duas vezes ao dia, por 3 dias, terminando esse protocolo, com 72h de vida, todos foram submetidos a eutanásia por decapitação. Os ratos separados de sua progenitora foram alimentados com fórmula artificial de Similac 1 (Abbot), 15 gramas, diluídas em 75ml de Esbilac, fórmula que ofereceu 200 Kcal/Kg/dia via gavagem. Os ratos foram alimentados com 0,4ml da fórmula de 4 em 4 horas até o quarto dia de vida. Esse protocolo foi descrito por Barlow et al., (1974) e Besner et al., (2006), envolvendo alimentação

com fórmula artificial hiperosmolar, hipóxia, hipotermia e estímulo com endotoxina para simular a indução de enterocolite necrosante como processo multifatorial, da mesma forma que acontece no recém-nascido prematuro em UTINeo.

3.3. PREPARO DO TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL E PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO DAS FEZES

Para o preparo do TMF, um rato saudável adulto jovem foi morto e foi coletado 1 grama de conteúdo fecal do intestino grosso comprimindo-o com a mão e uma espátula. As fezes foram homogeneizadas em 10 ml de PBS estéril e centrifugada por 30 segundos a 3.000 r.p.m. O valor de densidade óptica (DO) do sobrenadante foi analisado para identificar a concentração de bactérias por ml, sabendo por estudos anteriores que a DO igual a 0,5 equivale a 10^8 células (Li et al., 2015). Foi administrado 100 μ L por rato uma única vez por gavagem. Esse método foi desenvolvido por Li et al., (2015) e Seekatz et al., (2015) e adaptado para nosso laboratório.

O processo de esterilização de fezes foi padronizado em nosso laboratório. Uma grama de conteúdo fecal do intestino grosso foi removido de um rato saudável adulto jovem. As fezes foram homogeneizadas em 10 ml de PBS estéril e centrifugadas por 30 segundos a 3000 r.p.m. (1g/10ml). Dois ml de sobrenadante foram colocados em diferentes placas de petri e submetidas a diferentes tempos na capela com luz ultravioleta (U.V.) em comprimento de onda 240 a 330 nm, sendo estes: 30min; 1 hora; 1:30min; 2, 3 e 4 horas. Ao final da incubação em U.V. cada conteúdo fecal foi plaqueado em meio Mueller Hinton (aerobiose) e McConkey (anaerobiose), mantidos em estufa a 38°C e avaliado crescimento bacteriano até 48 horas após.

Contagem de colônias foi realizada e o cálculo foi baseado na fórmula abaixo e expressado em número e em UFC/ml.

$$\text{Média (duplicata)} \times \frac{1}{\text{diluição}} \times \frac{1}{\text{volume}}$$

3.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Nesse estudo foram utilizados ratos neonatos devido a sua fisiologia e desenvolvimento. Ao nascimento, os ratos apresentam similaridade ao desenvolvimento de um neonato humano prematuro entre a 24^a e 28^a semana de gestação, aos 3 dias de vida ele equivale a um neonato de 32 semanas de gestação (Ozdemir et al., 2011). Nesse primeiro dia

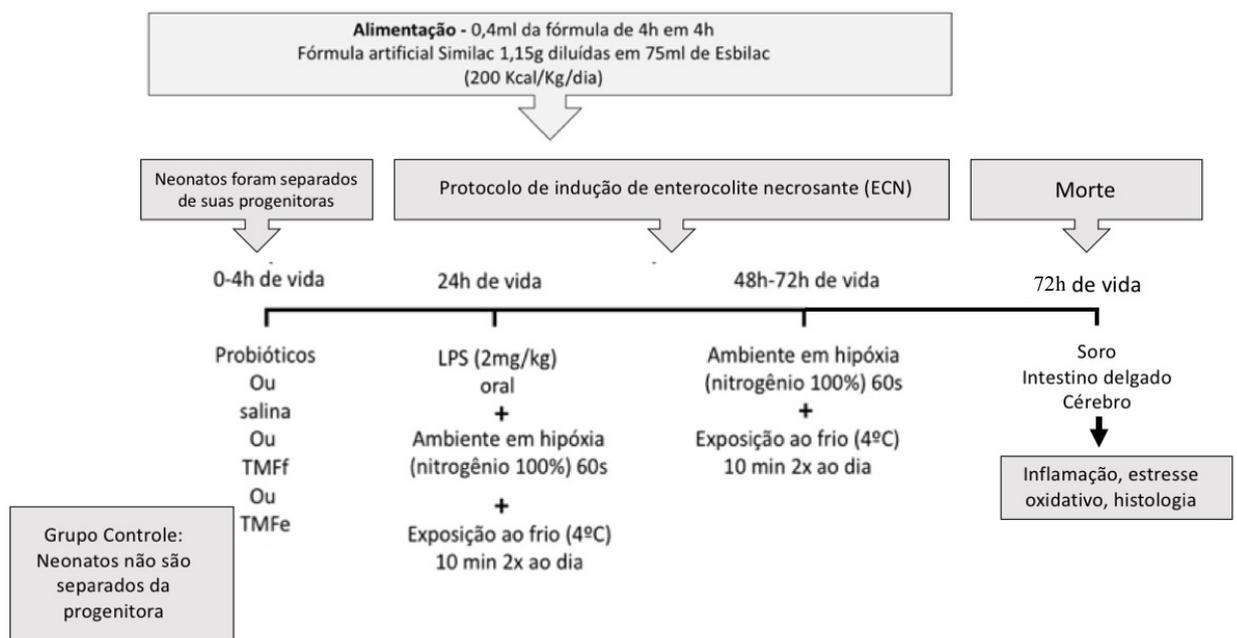
de vida os espécimes, além da fórmula artificial hiperosmolar, receberam uma das intervenções seguintes: probióticos, fezes frescas de um rato jovem ou fezes esterilizadas do mesmo espécime. Após 1 dia, foi intensificado o insulto intestinal semelhante a ECN, e após 3 dias os ratos foram mortos.

Animais foram divididos em cinco grupos:

- 1) Grupo controle (animais amamentados e mantidos com a mãe) n=10.
- 2) Grupo ECN + salina n=20.
- 3) Grupo ECN + TMF n=20.
- 4) Grupo ECN + TFE n=20.
- 5) Grupo ECN + probióticos *Lactobacillus acidophilus* (THT SA- Bélgica) + *bifidobacterium bifidum* (THT SA - Bélgica) 10^9 UFC cada (Lin et al., 2008) n=20.

Todos animais receberam seus respectivos tratamentos no primeiro dia de vida, foram alimentados de 4 em 4 horas com a fórmula anteriormente descrita e submetidos ao protocolo de ECN, sendo acompanhados por até 72 horas e sacrificados logo após para coleta de soro (200ul), cérebro total e porção íleo-terminal do intestino delgado para análise de inflamação local e periférica além de dano oxidativo, nitrosativo e lesão tecidual.

Figura 2: Esquema simplificado da metodologia:



3.5 NÍVEIS DE CITOCINAS

As concentrações de IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram determinadas em soro e homogenato de cérebro e intestino através da técnica de imunensaio enzimático (ELISA) do tipo sanduiche. Foi utilizado kit comercial (R&D System) e seguido protocolo de acordo com informações do fornecedor. A leitura foi realizada em espectrofotometro em comprimento de onda 450nm e a unidade de medida utilizada foi de pg/ml.

3.6 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da mieloperoxidase é um indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual. Para isso, o tecido foi homogeneizado (50 mg/ml) em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado. A suspensão foi sonicada e alíquota do sobrenadante foi misturada com solução de 1.6 mM TMB e 1 mM H₂O₂. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650nm a 37°C. Os resultados foram expressos como mU/mg proteína (De Young et al., 1989).

3.7 NITRITO/NITRATO

A concentração de nitrito/nitrato é um indicativo da quantidade de oxido nítrico presente nas amostras. A concentração foi mensurada pela reação de Griess na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa. A reação é controlada pelo tempo, e o produto foi determinado 2 horas após a mistura dos reagentes. A leitura foi por absorvância de 550 nm usando leitor de microplaca. Resultados foram expressos como nmol/mg proteína (Green et al., 1982).

3.8 DANO OXIDATIVO

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácido-aquecimento é amplamente adotado como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético a 10% e 1 ml de 0,67% TBA. Posteriormente foram aquecidas em banho de

água fervente durante 30 min. Equivalentes ao malondialdeído (MDA) foram determinados por absorvância a 532 nm utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de MDA (nmol/mg de proteína) (Draper & Hadley 1990).

O dano oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupamentos carbonil do conteúdo da amostra, com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em DNPH. A unidade de medida foi nmol/mg protein e a absorvância de 370 nm (Levine et al., 1990).

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantidade total de proteínas de cada técnica foi mensurada usando o ensaio de Lowry. Reagente fenol de Folin foi adicionado a amostras onde sua principal função é ligar-se a proteínas, onde é posteriormente reduzido. A alteração de cor de amarelo para azul pode ser medida em absorvância a 700 nm. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão (Lowry et al., 1951).

3.10 HISTOLOGIA

Imediatamente após a morte, amostras da porção íleo-terminal do intestino delgado foram dissecadas. As amostras foram lavadas com soro fisiológico e imediatamente após imersas em paraformaldeído a 4% permanecendo por 48 horas; após esse período os tecidos foram transferidos para etanol 70% e armazenados para posterior análise histológica. Tecidos foram emblocados em parafina e a partir dos blocos foram confeccionadas as lâminas que foram coradas com hematoxila-eosina. A graduação da lesão foi realizada por escore desenvolvido por Caplan et al., (1994), por 2 pesquisadores treinados e sem o conhecimento a qual grupo pertencia as lâminas. Nesse sistema o grau 0 é considerado normal, sem lesão; o grau 1 quando há separação ou elevação da mucosa; grau 2 quando há edema e lesão da mucosa até o nível da metade da vilosidade intestinal; grau 3 quando há necrose de toda vilosidade intestinal e grau 4 quando há necrose transmural.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram apresentadas na forma de média \pm desvio padrão e comparadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* quando

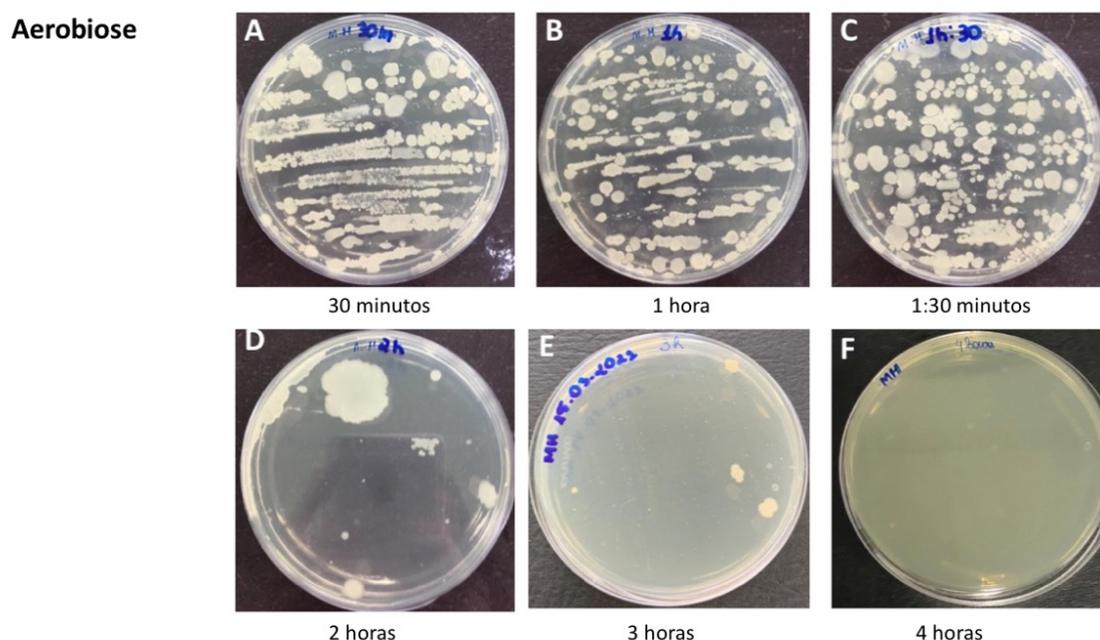
o F foi significativo. Todos os testes foram realizados com auxílio do programa SPSS versão 21 e/ou GraphPad Prism 4.0. Em todas as análises foi adotado um p-valor < 0,05 como nível para significância estatística.

4. RESULTADOS

O primeiro objetivo dessa pesquisa foi padronizar a esterilização de fezes para o protocolo de TMF estéril. A figura 3 apresenta os resultados de cada tempo de incubação em luz U.V., sendo 30 min (A); 1 hora (B); 1:30h (C); 2h (D); 3h (E) e 4h (F) em condições de aerobiose e anaerobiose.

O crescimento bacteriano permanece alto até 1:30 min de exposição a luz U.V. ($n > 200$ ou 2×10^6 UFC/ml). A partir de 2 horas ocorre uma redução importante ($n = 12$ ou $1,2 \times 10^7$ UFC/ml), mas somente a partir de 4 horas que não há mais crescimento de colônias ($n=0$) e, portanto, pode se considerar que as fezes foram completamente esterilizadas neste tempo (Tabela 1). Esse ensaio serviu de base para o preparo do TMF que foi administrado no grupo de neonatos induzidos a ECN (ECN + TMF estéril).

Figura 3: Crescimento de colônias bacterianas de fezes expostas a diferentes tempos de luz U.V. para padronização de TFE.



Anaerobiose

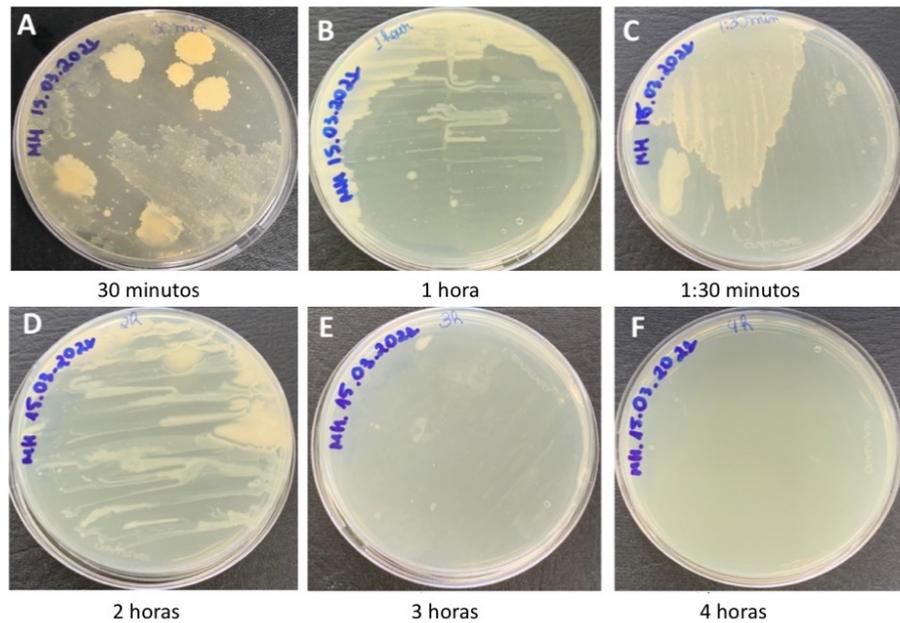


Figura 3: Imagens representativas de TMF em processo de esterilização. Conteúdo fecal do intestino grosso foi removido de um rato saudável adulto, as fezes foram homogeneizadas em PBS estéril. Dois ml de sobrenadante foram colocados em placas de petri e submetidas a diferentes tempos a luz U.V. Ao final da incubação cada amostra foi plaqueada em meio Mueller Hinton (aerobiose) e McConkey (anaerobiose) e avaliado crescimento bacteriano até 48 horas após. 30min (A); 1 hora (B); 1:30min (C); 2 horas (D), 3 horas (E) e 4 horas (F).

Tabela 1: Contagem das colônias

Exposure time	Condições aeróbicas		Condições anaeróbicas	
	Número	UFC/ml	Número	UFC/ml
30 minutos	>200	2×10^6	>200	2×10^6
1 hora	>200	2×10^6	>200	2×10^6
1:30 minutos	>200	2×10^6	>200	2×10^6
2 horas	12 ± 2	$1,2 \times 10^7$	>200	2×10^6
3 horas	5 ± 1	$0,5 \times 10^7$	4 ± 1	$0,4 \times 10^7$
4 horas	0	0	0	0

(média \pm desvio padrão) e UFC/ml; n=5.

Inflamação sistêmica foi mensurada em soro de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos (Fig 4). IL1 β e IL6 são consideradas citocinas pró-inflamatórias e estão aumentados no grupo ECN sem tratamento e também no grupo tratado com TMF (Fig 4A e 4B). No grupo ECN, ECN+ TFE e ECN+TMF houve o aumento de IL6, ainda que os grupos tratados com as duas formas de fezes tenham demonstrado tendência a redução, já os probióticos não causaram aumento de ambas interleucinas.

IL-10, uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, também foi mensurada em soro de neonatos submetidos a ECN (Fig 4C). Ocorre diminuição dos níveis de IL-10 no grupo ECN, por outro lado, percebe-se aumento considerável em todos os grupos tratados. Dessa forma na medida que aumenta a resposta inflamatória sistêmica, também aumenta a IL10 anti-

inflamatória, trazendo um certo equilíbrio ao contrário da ECN que não tem esse efeito. O TFE e Probióticos atuam no aumento da IL-10 mas não nas interleucinas pró-inflamatórias

Figura 4: Níveis de citocinas em soro de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos

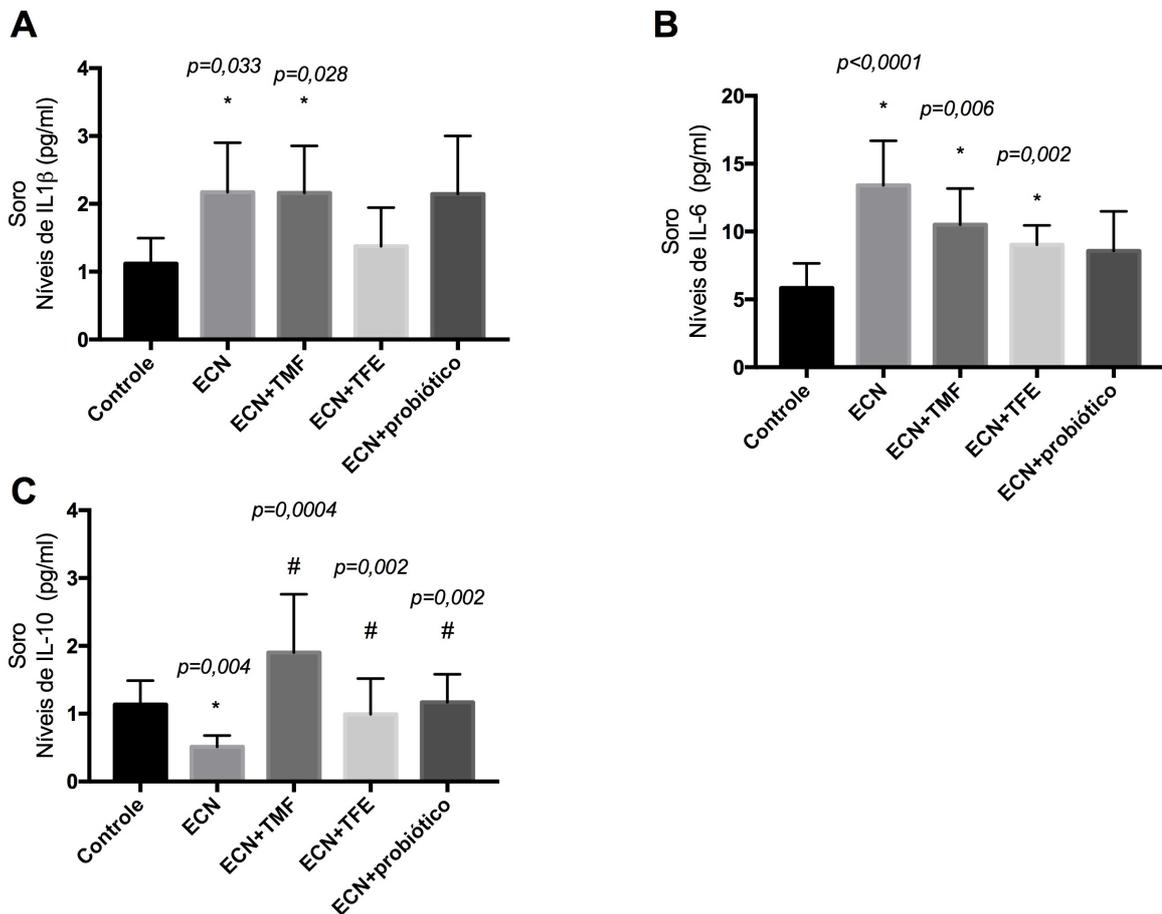


Figura 4: Níveis de interleucinas IL-1 (A); IL-6 (B) e IL-10 (C) em soro de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos. Amostras foram analisadas por ELISA e quantificados como pg/ml. Os dados são apresentados como média \pm DP. n=12 por grupo. *diferente de controle; # diferente de ECN. valor de $p < 0,05$.

A MPO é uma enzima abundante em neutrófilos e pode ser utilizada como indicativo de inflamação local. A atividade da MPO foi mensurada em cérebro de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. Os resultados indicam que há aumento da atividade dessa enzima em tecido cerebral e que todos os tratamentos reduziram esse efeito (Fig 5A).

Ainda, como indicativo de inflamação local, citocinas pró (IL-1 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) foram mensuradas em cérebro dos animais. A figura 5B e 5C demonstram aumento significativo de IL1 e IL-6 nos neonatos submetidos a ECN e embora IL-1 esteja

aumentada no grupo ECN + TFE, os níveis de IL-6 diminuiram consideravelmente nos grupos tratados com TMF fresco e estéril. Já IL-10 está diminuída no grupo ECN e aumento é observado somente no grupo tratado com TFE. O grupo tratado com probiótico não apresentou diferença significativa em nenhuma citocina avaliada. Aparentemente em relação ao tecido cerebral o TFE demonstrou pouco aumento na atividade inflamatória, com efeito predominante anti-inflamatório.

Figura 5: Atividade da mieloperoxidase e níveis de citocinas em cérebro de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos

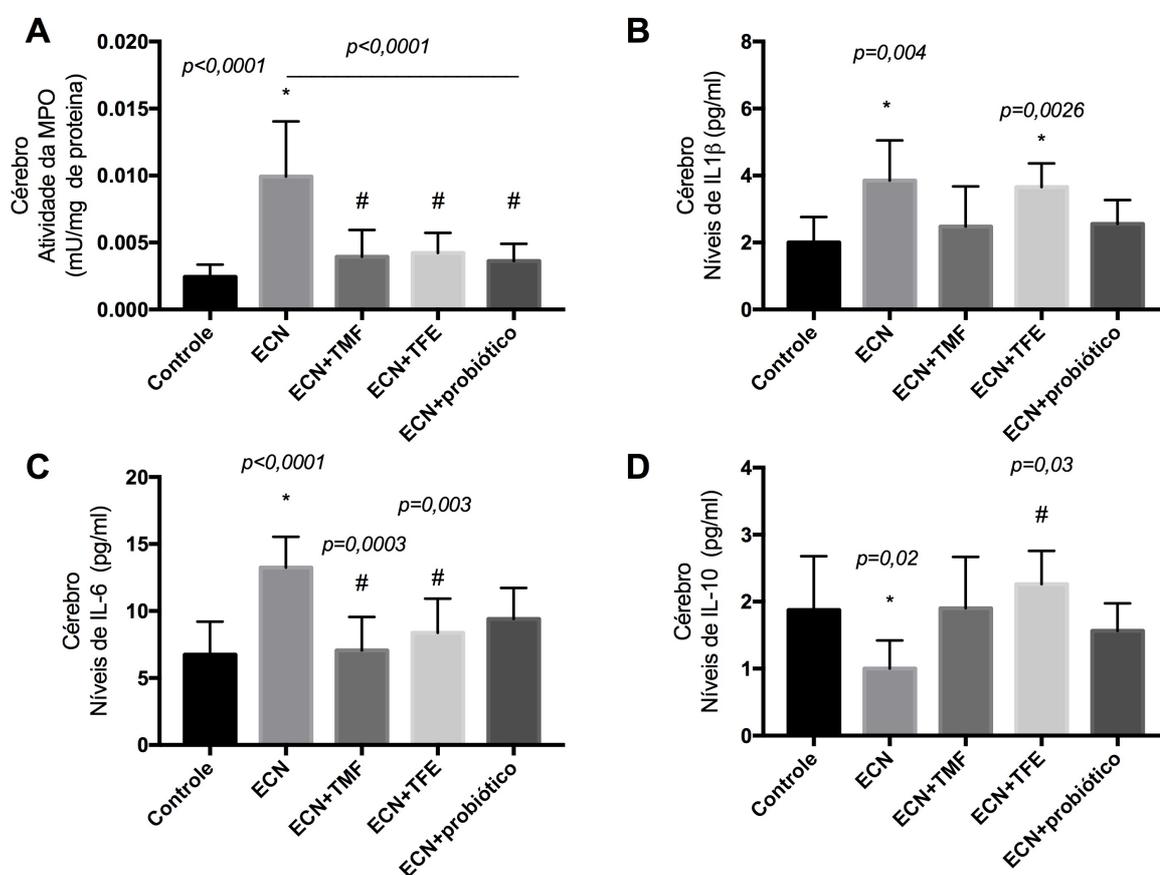


Figura 5: Atividade da MPO (A) e níveis de interleucinas IL-1 (B); IL-6 (C) e IL-10 (D) em cérebro de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. Amostras foram analisadas por ELISA e quantificados como pg/ml. Os dados são apresentados como média ± DP. n=12 por grupo. *diferente de controle; # diferente de ECN. valor de p <0,05.

Em intestino a presença de inflamação foi avaliada. Atividade da MPO está aumentada no grupo ECN e nos grupos tratados com TMF estéril e probióticos (Fig 6A). Os níveis de citocinas pró inflamatórias apresentaram mesmo padrão de níveis: ocorre aumento

no grupo ECN e melhora significativa nos grupos tratados com ambos TMF fresco e estéril (Fig 6B e 6C). O tratamento com probióticos não apresentou diferença. Níveis de IL-10 em intestino não tiveram alteração alguma em nenhum grupo (Fig 6D).

Figura 6: Atividade da mieloperoxidase e níveis de citocinas em intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.

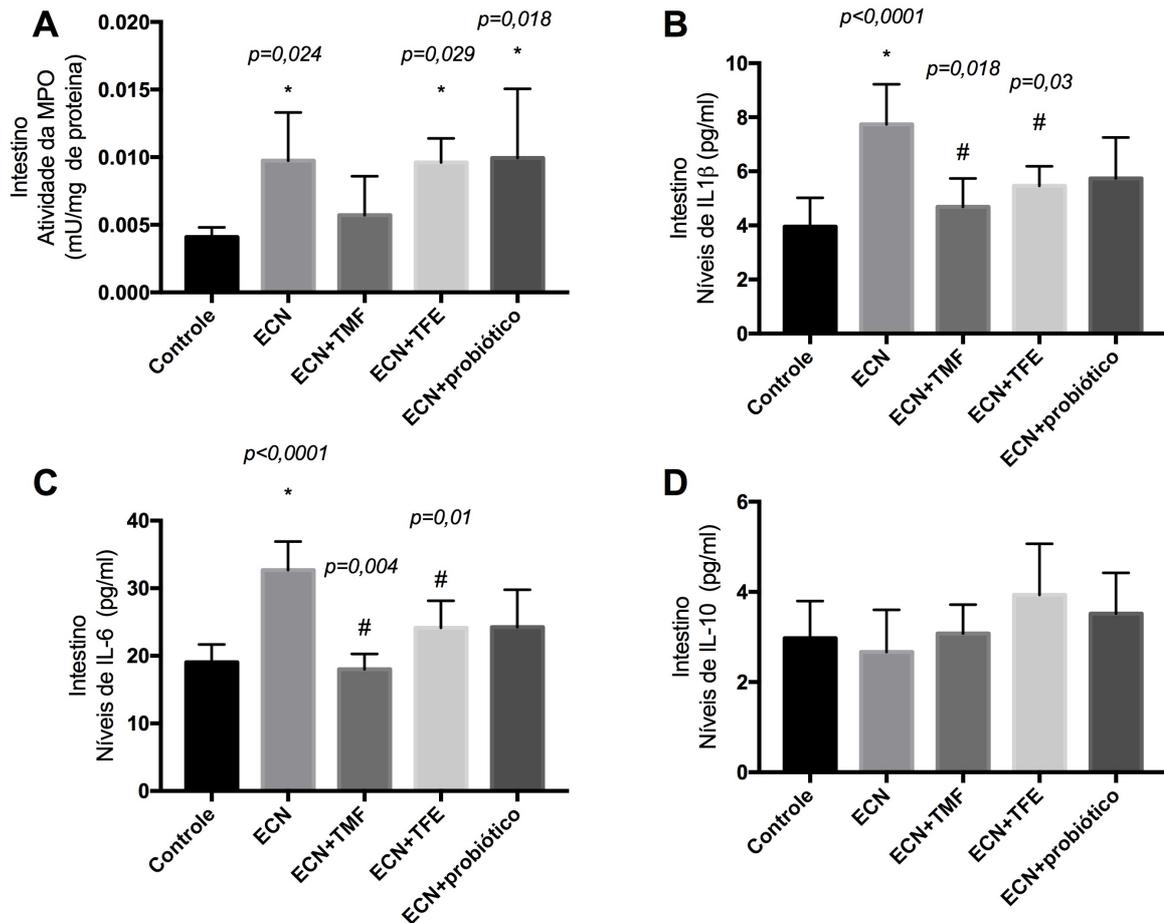


Figura 6: Atividade da MPO (A) e níveis de interleucinas IL-1 (B); IL-6 (C) e IL-10 (D) em intestino de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. Amostras foram analisadas por ELISA e quantificados como pg/ml. Os dados são apresentados como média \pm DP. n=12 por grupo. *diferente de controle; # diferente de ECN. valor de $p < 0,05$.

Dano oxidativo foi avaliado no cérebro e intestino de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF, TFE ou probióticos. Em relação ao dano oxidativo no cérebro, não houve diferença entre os grupos e no intestino somente o TMF foi efetivo na diminuição da lesão oxidativa em lipídeos mas não em relação as proteínas. Enquanto o TFE causou um aumento de proteínas carboniladas no intestino como vemos na figura 8B. É suposto que esses

resultados sejam decorrentes da esterilização das fezes com U.V., e que as proteínas carboniladas reflitam os metabólitos e restos celulares do TFE.

Figura 7: Dano oxidativo a lipídeos em cérebro e intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos

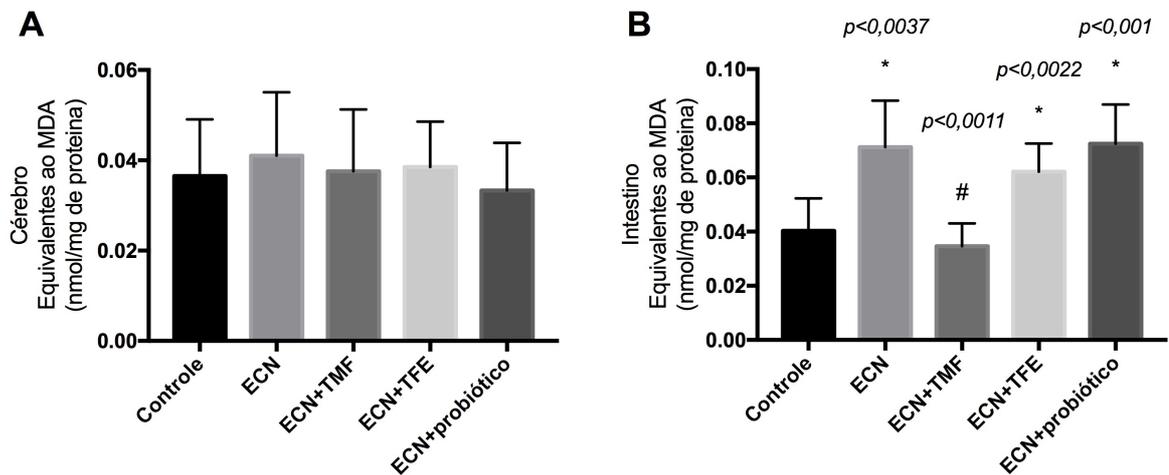


Figura 7: Dano oxidativo em lipídeos avaliado pela técnica de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em cérebro (A) e intestino (B) de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. Amostras foram expressas como nmol/mg de proteína. Os dados são apresentados como média \pm DP. n=12 por grupo. *diferente de controle; # diferente de ECN. valor de $p < 0,05$.

Figura 8: Dano oxidativo a proteínas em cérebro e intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.

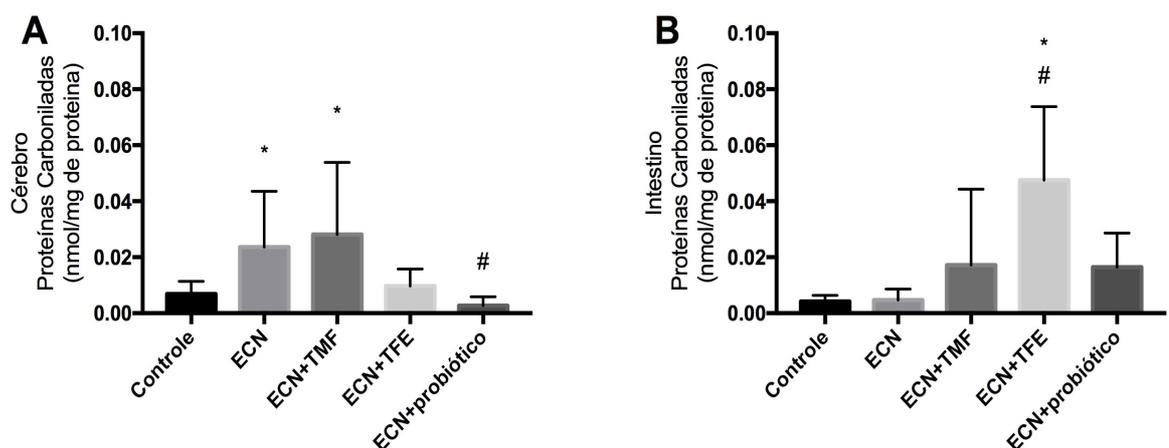


Figura 8: Dano oxidativo em proteínas avaliado pela técnica de carbonilação de proteínas em cérebro (A) e intestino (B) de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. Amostras foram expressas como nmol/mg de proteína. Os dados são apresentados como média \pm DP. n=12 por grupo. *diferente de controle; # diferente de ECN. valor de $p < 0,05$.

Analizamos ON no cérebro e intestino dos espécimes, e não houve diferença significativa em nenhum dos grupos. Esse resultado pode ter ocorrido provavelmente por sua meia vida curta e incorporação a outras espécies reativas de nitrogênio e oxigênio não dosadas no experimento.

Figura 9: Presença de óxido nítrico em cérebro e intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.

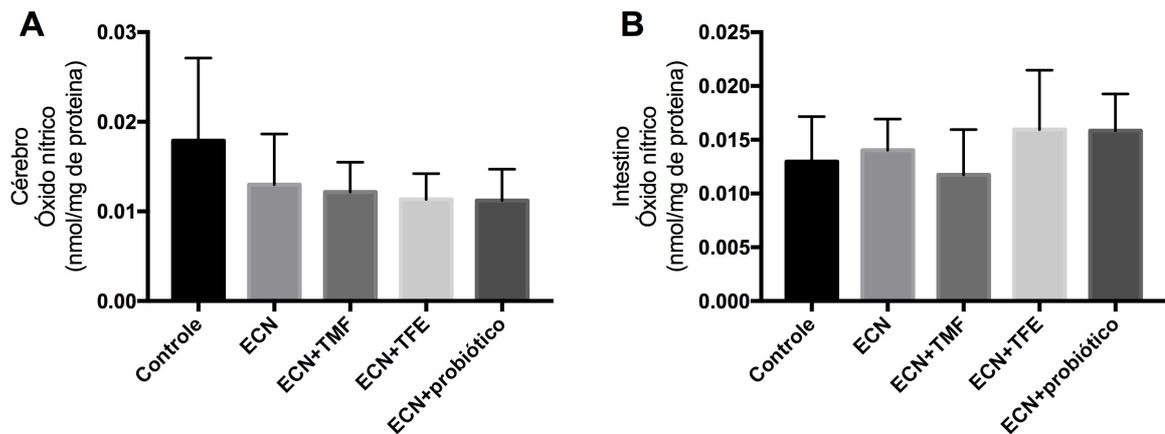


Figura 9: Presença de óxido nítrico avaliado pela técnica nitrito/nitrato em cérebro (A) e intestino (B) de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. Amostras foram expressas como nmol/mg de proteína. Os dados são apresentados como média \pm DP. n=12 por grupo. *diferente de controle; # diferente de ECN. valor de p <0,05.

A figura 10 apresenta imagens representativas e a pontuação score de intestino de animais controle ou submetidos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos. As imagens em aumento 40x apresentam a camada submucosa e o lúmen, além das vilosidades intestinais. No grupo controle percebe-se vilosidades imaturas e preservadas, enquanto que no grupo ECN percebe-se as vilosidades encurtadas e danificadas. A tabela 2 mostra que ambos tratamentos (TMF e TFE) foram eficazes em reduzir o dano histológico e por sua vez o grupo tratado com probióticos não apresentou diferença significativa.

Figura 10: Lesão tecidual em intestino de neonatos expostos a ECN e tratados com TMF fresco ou estéril ou probióticos.

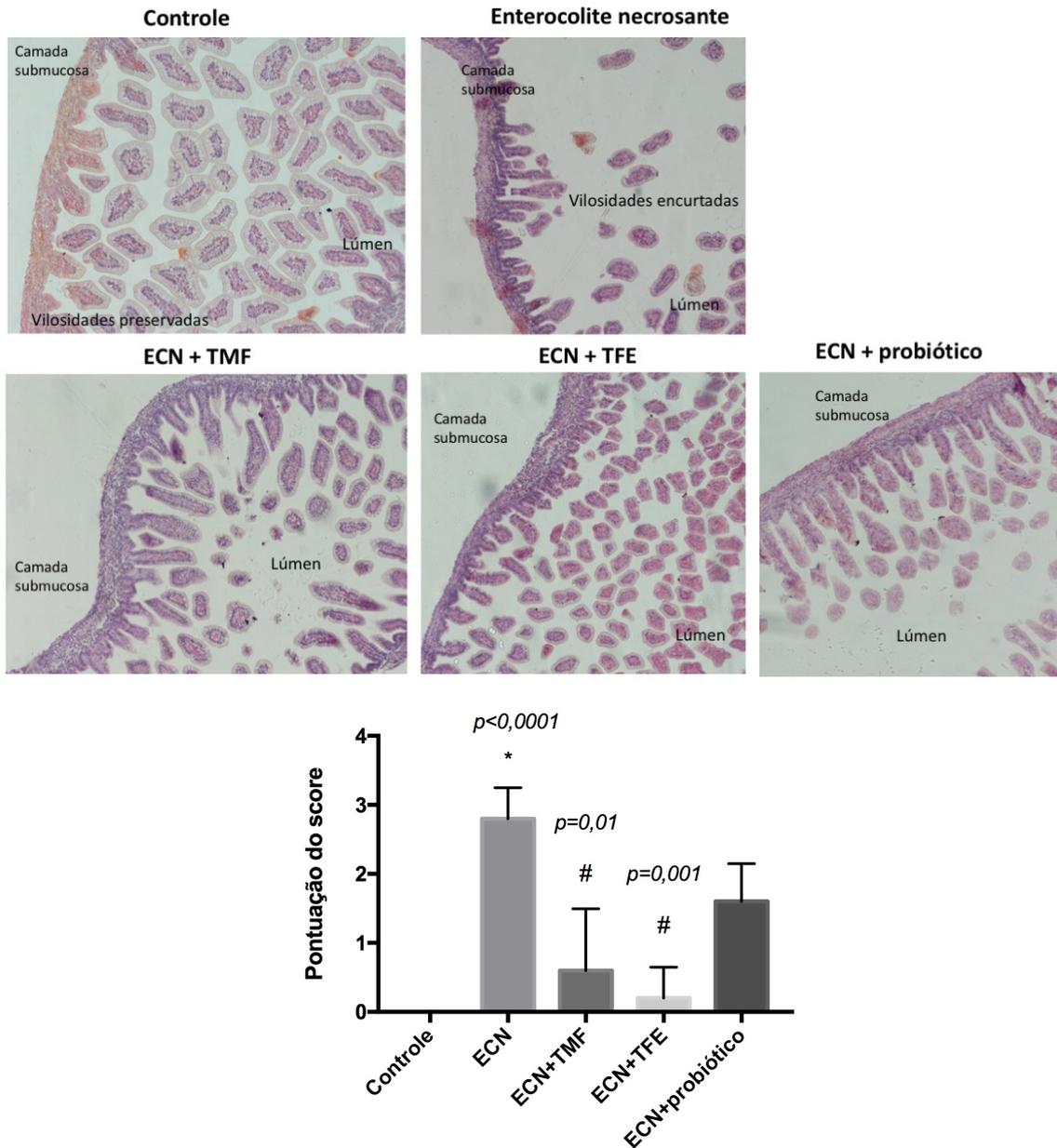


Tabela 2- Análise histológica no intestino delgado

	Controle	ECN	ECN + TMF	ECN + TFE	ECN + probiótico
Grau	0	3	2	0	2
	0	2	1	1	2
	0	3	0	0	2
	0	3	0	0	1
	0	3	0	0	1

Figura 10: Imagens representativas de intestino de neonatos submetidos a ECN e tratados com TMF fresco, estéril ou probióticos. Imagens em tamanho 40x apresentam camada submucosa e lúmen, além das vilosidades intestinais. Grupo controle (A); ECN (B); ECN + TMF (C); ECN + TFE (D); ECN + probiótico (E).

5. DISCUSSÃO

O TMF é uma terapia ancestral, recentemente retomada, que tem mostrado resultados promissores. A primeira descrição de seu uso foi na China, há 1700 anos atrás, onde uma “sopa amarela” era utilizada para tratamento de intoxicação alimentar. Os beduínos também consumiam fezes de camelo para tratar disenteria. Idéias sobre o papel dos micróbios intestinais na saúde, foram propagados por Elie Metchnikoff, Christian Paullini e se espalharam entre os médicos europeus no século 18 (Keskey et al., 2020). Os estudos dessa terapia são na maioria concentrados a doenças clínicas gastrointestinais, principalmente em infecção recorrente por *Clostridium difficile*, ou em testes pré-clínicos e tem apresentado resultados interessantes com poucos efeitos colaterais, tornando crescente o interesse dos especialistas em aprofundar o conhecimento sobre essa abordagem (Keskey et al., 2020). Poucos são os estudos publicados do efeito do TMF em ECN, a maioria ainda são experimentais e recentemente nosso grupo de pesquisa apresentou resultados sob o efeito do TMF na inflamação e estresse nitro e oxidativo (Prado et al., 2019).

Há muitas formas de administração do transplante, por gavagem, por enema, liofilizado, congelado, etc. O trabalho de Papanicolas et al, 2019, demonstra que ao manipularmos as fezes em meio anaeróbio, já há perda 50% do bactérias (Papanicolas et al., 2019). Em meio aeróbio como usualmente é feito, só cerca de 19 a 23% das bactérias são viáveis, com perda significativa das produtoras de SCFA. Os métodos de 16S rRNA qPCR superestimam a população bacteriana pois analisam a quantidade total de DNA na amostra. Quando a mesma é combinada com propidium monoazida, um corante fluorescente vermelho que penetra as células com compromisso na membrana, se identifica a diminuição das células bacterianas viáveis descritas (Papanicolas et al., 2019). Observando a variabilidade da resposta, mesmo quando o transplante não é totalmente incorporado ao receptor, e o papel dos demais componentes presentes no transplante, a proposta dessa pesquisa foi utilizar o TMF, comparando com o TFE e probióticos na prevenção da ECN.

O processo de esterilização de fezes já foi descrito em modelos por filtração de fezes, contudo propusemos uma nova metodologia que pudesse alcançar a eficácia necessária e suficiente para tornar o TMF estéril através de um método simples de radiação U.V. A radiação ultravioleta é um processo físico que pode ser utilizado para a esterilização de diversos materiais. O tratamento com radiação ultravioleta tem uma longa e eficiente história no controle microbiológico (Stannard et al., 1983). A irradiação ultravioleta tem efeito microbicida se usada com intensidade e tempo de exposição suficientes, encontrando

diversas aplicações como esterilização de ar, superfícies de equipamentos, embalagens e materiais.

A radiação U.V. explora diferentes bandas de comprimento de onda sendo UVC (200–280 nm) que é superior a UVB (280–300 nm) e UVA (320–400 nm). O dano molecular irreversível ideal ocorre em torno do comprimento de onda 260 nm (Rowan, 2019). Comprimentos de onda menores que 200 nm são ineficientes para esterilização, pois as ondas são rapidamente absorvidas por oxigênio e água. As radiações U.V. na faixa de 240 a 330 nm são mais eficientes como germicidas porque são absorvidas por proteínas e ácidos nucleicos, causando ruptura cromossômica, mutações genéticas e inativação de enzimas e, conseqüentemente, morte celular (Bayliss et al., 1979; Torres et al., 2020). Em vírus e bacteriófagos cerca de 60 segundos são suficientes para eliminação (Torres et al., 2020). Baseado nesses aspectos, nossos resultados têm mostrado eficácia no protocolo proposto a partir de 3 horas de exposição do TMF a radiação U.V. Esse método simples, mas eficaz, permitiu dar segmento aos estudos para comparar a eficácia do TMF estéril e fresco.

Os resultados dessa pesquisa têm mostrado que ambas abordagens do TMF (fresco ou estéril) apresentam resultados bastante semelhantes. Presença de inflamação e estresse oxidativo foram avaliados nos grupos propostos a nível local e sistêmico. As estruturas avaliadas foram intestino e cérebro, justamente para compreender os efeitos do TMF no eixo intestino-cérebro. Como esperado, processo inflamatório e níveis de estresse oxidativo estão aumentados no grupo ECN. Sabe-se que alteração patológica da microbiota intestinal e comprometimento da função da barreira intestinal, como ocorre na ECN, podem influenciar na imunidade e iniciar uma resposta inflamatória e, portanto, refletir na saúde e no comportamento do hospedeiro (Fung et al., 2017). Ambos tratamentos diminuíram a resposta inflamatória local (intestino) e também no cérebro. Surpreendentemente, o TFE possui efeitos significativos quando comparado ao uso de probióticos, que são o meio mais estudado (Sharif et al., 2020).

A ECN impacta diretamente a estrutura intestinal, e isso foi relatado em nossos resultados. Lesões histológicas foram claramente detectadas no intestino delgado dos neonatos com ECN e, conforme estudo de Li et al. (2017), o número e a diversidade da microbiota também estão alterados, desencadeando um quadro inflamatório grave. Já foi descrito que a colonização da microbiota com maior biomassa virulenta tem forte relação com quadro inflamatório intestinal, (Ganguli et al., 2013; Keskey et al., 2020). Estudos também demonstraram que a resposta pró-inflamatória na mucosa intestinal está intimamente associada a produção de estresse oxidativo, acompanhada de permeabilidade da mucosa tornando vulnerável a invasão bacteriana (Good et al., 2012; Yazji et al., 2013). Os radicais

livres produzidos no tecido geram lipoperoxidação, formação de aldeídos e outros produtos altamente citotóxicos, o que, por sua vez, induzem ao aumento da permeabilidade da membrana celular, levando a danos teciduais no intestino e cérebro. Além da peroxidação lipídica, os radicais livres podem oxidar aminoácidos, resultando na formação de grupos tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função e a estrutura normal da proteína (Barichello et al., 2007). Conforme nossos resultados, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão elevados no quadro de ECN, bem como a medida de lesão oxidativa, demonstrando que o modelo de gavagem com fórmula artificial e hipóxia, altera as redes imunológicas sistêmicas nos neonatos.

Em nível de filo, as alterações da microbiota em neonatos com ECN são caracterizadas por *Firmicutes* e *Bacteroidetes* diminuídos e *Proteobacteria* aumentada, e em nível de gênero por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* diminuídos e *Gammaproteobacteria* aumentada (Neu 2014; Liu et al., 2019). Teoricamente, corrigir a disbiose intestinal pode contribuir para a recuperação do dano intestinal da ECN. Os métodos propostos de uso do TMF promovem o restabelecimento da microbiota intestinal e aceleram o aumento da diversidade microbiana (Konturek et al., 2015), e embora probióticos de cepas de *Lactobacillus* protejam da infecção prevenindo a colonização e virulência de micróbios patogênicos (Ganguli et al., 2015), nenhum papel consistente foi observado até hoje para algumas espécies probióticas comuns de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em ECN (Repa et al., 2015). Ainda que seguros e utilizados em fase 2 e 3 de pesquisa clínicas, há preocupação no uso de probióticos no público alvo, os prematuros extremos, visto que de maneira contraproducente os mesmos podem impedir a capacidade de refaunação da microbiota intestinal (Zeng et al., 2019; Keskey et al., 2020). Em nossos resultados os probióticos apresentaram uma melhora significativa, mas de modo geral os resultados do TMF e TFE foram melhores nos parâmetros avaliados. Li et al (2017) mostraram que os níveis de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* diminuíram significativamente em camundongos submetidos a modelo de ECN e só se recuperaram após o tratamento com TMF, e isso pode ser justificado pelo fato de que esse grupo de bactérias probióticas seja sensível a mudanças ambientais na fase inflamatória grave, mas que ela se recupera após a administração de TMF. Além disso, já foi descrito que o nível de *E. coli* aumenta após quadro de ECN, mas diminui significativamente após tratamento com TMF (Li et al., 2017).

Li et al (2017) mostraram diminuição geral na produção de óxido nítrico após tratamento com TMF em modelo de ECN devido processo de S-glutacionilação da eNOS. O processo de S-glutacionilação da eNOS indiretamente diminui o processo inflamatório ativado pela via TLR-4 que é responsável por causar a lesão tecidual no intestino, fornecendo uma

justificativa para o uso de TMF no tratamento da ECN (Li et al., 2017). Contudo em nosso experimento não encontramos diferença significativa em relação ao óxido nítrico mensurado, provavelmente por sua meia vida curta, possivelmente a medida de dano nitrosativo às proteínas poderia nos dar mais informações. Foi demonstrado que o TMF suprimiu a apoptose intestinal e a translocação bacteriana através da barreira intestinal (Li et al., 2017; Liu et al., 2020). Recentemente Liu et al (2020) demonstraram que o tratamento com TMF diminuiu significativamente a expressão de mRNA de citocinas IL6 e TNF- α , enquanto a expressão de Claudin-7 está aumentada, indicando que o TMF pode aliviar a gravidade da ECN ao diminuir a inflamação intestinal e aumentar a função da barreira intestinal (Liu et al., 2020).

Outro objetivo proposto nessa pesquisa foi avaliar o efeito do TMF no eixo cérebro-intestino. O eixo cérebro-intestino-microbiota desempenha papel importante na homeostase e, conseqüentemente, nos estados de saúde e doença (Mu et al., 2016; Rea et al., 2016). Rea et al., (2016) define essa interação como um relacionamento multidirecional, no sentido de que cada componente tem a capacidade de moderar e manipular a função dos outros sistemas envolvidos. A comunicação entre o cérebro e o intestino é mantida por meio de uma rede complexa, incluindo o sistema nervoso [central, autônomo e entérico], eixo HPA, sistema neural, endócrino e imunológico (Carabotti et al., 2015; Mayer, 2011; Moloney et al., 2014, Keskey et al., 2020). Essencialmente, o eixo cérebro-intestino-microbiota influencia nas funções motoras, sensoriais e secretoras do intestino, enquanto simultaneamente permite que sinais e metabólitos da microbiota intestinal influenciem o desenvolvimento do cérebro, bioquímica, função e comportamento (Cryan e O'Mahony, 2011; Grenham et al., 2011; Marques et al., 2014). Níveis elevados de TNF- α e HMGB1 induzidos pela enterocolite aumentam a neuroinflamação e induzem a apoptose cerebral. A ação da microbiota hostil ao interferir no HPA, também altera a capacidade do SNC de resolver a inflamação, perpetuando a mesma, levando a encefalopatia séptica (Keskey et al., 2020). Os resultados desse estudo mostram os efeitos benéficos do TMF e TFE no eixo cérebro-intestino-microbiota e demonstram que a ação de ambos provavelmente está relacionada a produtos do metabolismo bacteriano e substâncias presentes nas fezes, entre eles, como os SCFA (Keskey et al., 2020; Chen et al., 2019). O ácido butírico é um SCFA, principal fonte de energia para o cólon e dessa forma mantém a integridade da barreira mucosa, o que por sua vez, protege a barreira hemato-encefálica (Chen et al., 2019). Da mesma maneira que em revisões sistemáticas o uso de probióticos não foi efetivo na proteção do SNC no modelo utilizado (Sharif et al., 2020). Isso demonstra que a interação da microbiota com a mucosa intestinal e seus receptores de reconhecimento padrão não são o único mecanismo de ação presente. Além disso, estudos animais (Lyte et al., 2016; Ávila et al., 2020) já evidenciaram que essa informação também é

transmitida do intestino ao cérebro através do nervo vago, embora não tenhamos investigado nesse estudo.

O TMF influencia o sistema imune através de dois mecanismos principais: a exposição do hospedeiro a componentes da microbiota do doador, e pela produção de metabólitos. O polissacarídeo A provindo do *Bacteroides fragilis*, por exemplo, interage com TLR2 das células dendríticas (CD) na barreira intestinal aumentando a produção de IL-10 e promovendo ação das Tregs (Burrello et al., 2018; Mishima et al., 2019; Keskey et al., 2020). As Tregs podem secretar TGF- β , IL-10 e IL-35 anti-inflamatórias, bem como antígeno citotóxico linfocítico T e co-estimulador indutor de células T (Zeng et al., 2019; Quraishi et al., 2020). As bactérias filamentosas segmentadas (BFS) também interagem com as CD resultando no aumento de células TH-17 no intestino, elas são essenciais para manter a homeostase através da sua habilidade de estimular a produção de muco e peptídeos antibacterianos, ambos essenciais para manutenção da barreira mucosa (Keskey et al., 2020; Burrello et al., 2018; Mishima et al., 2019).

Entre os metabólitos da microbiota, o ácido bórico, promove a multiplicação de células Treg, macrófagos intestinais e macrófagos derivados da medula óssea (Chen et al., 2019; Keskey et al., 2020; Liu et al., 2020). Ele pode agir através dos receptores acoplados a proteína-G ou mesmo como inibidor histona deacetilase, diminuindo as citocinas pró-inflamatória reguladas pelo NFkB, como TNF- α e IL-6, alterando a expressão de genes dessas células imunes e modulando a resposta ao estímulo microbiano (Adelman et al., 2020). Outro metabólito, como os hidrocarbonetos arila interagem com as células linfoides inatas para produção de IL-22, o que é fundamental para produção de peptídeos antimicrobianos (Keskey et al., 2020; Quraishi et al., 2020; Sun et al., 2018). A conversão de ácidos biliares conjugados em não conjugados no intestino é mediada por enzimas bacterianas não produzidas por mamíferos, as hidrolases dos sais biliares (HSB), e esses ácidos biliares não conjugados inibem o crescimento de organismos patogênicos (Mullish et al., 2019; Sun et al., 2018). Um mecanismo de ação do TMF é restaurar a presença de bactérias e arqueias produtoras de HSB, o que é relacionado a resolução da irCD e infecção por *Campylobacter jejuni*, ainda que outros mecanismos estejam envolvidos (Mullish et al., 2019; Sun et al., 2018; Khoruts et al., 2016).

Ao ser realizado o TMF são transferidos outros membros da microbiota, e mais atenção tem sido dada em estudos recentes aos bacteriófagos e sua capacidade de modular a microbiota e sua função (Draper et al., 2020). Em experimento de Draper et al, 2020; o transplante de fezes filtradas retendo seus bacteriófagos foram capazes de restaurar a microbiota pós exposição a antibióticos, enquanto naquelas tratadas com calor e nucleases, eliminando os bacteriófagos, não foram (Draper et al., 2020; Rasmussen et al., 2020). Essa

forma de transplante tem sido chamada de transplante de viroma fecal (TVF), e tem sido estudada no tratamento de obesidade, diabetes tipo 2, irCD e ECN (Rasmussen et al., 2020). Mesmo o sucesso do TMF na irCD pode estar relacionado a diversidade dos bacteriófagos do doador e diminuição da quantidade total do mesmo no receptor (Park et al., 2019). Demonstrou-se em pacientes com irCD tratados com TMF, o viroma do doador era incorporado e dominante por até doze meses após o transplante (Quraishi et al., 2020). Os bacteriófagos aderem fortemente ao muco intestinal, mais que à luz, e agem por vários mecanismos. O mais relatado se refere ao aumento da replicação viral em situações de mudança do pH, antibióticos, e estresse celular, o que levam a lise das bactérias mais abundantes, promovendo o retorno a diversidade (Rasmussen et al., 2020; Quraishi et al., 2020). Os bacteriófagos Caudovirales aumentam a produção de IFN- γ , via TLR-9, o que além dos efeitos na maturação das CD, inibe a produção de citocinas inflamatórias (Quraishi et al., 2020). Em experimento de Brunse et al 2020, o TVF foi efetivo em prevenir ECN em modelo suíno, evitando disbiose e supercrescimento bacteriano (Brunse et al., 2020). Ainda que estejam presentes no TMF, há preocupação sobre a transferência de vírus que atinjam as células do receptor e possam causar infecção secundária, ou sejam indutoras de câncer (Rasmussen et al., 2020).

No TFE são transferidos debris bacterianos, proteínas, compostos antimicrobianos, produtos do metabolismo, oligonucleotídeos e nanopartículas (Ott et al., 2017; Rasmussen et al., 2020). Vesículas extracelulares (VE, de tamanho entre 20 e 1000nm) são liberadas por células procarióticas e eucarióticas, carregando proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Rasmussen et al., 2020). As bacteriocinas são nanopartículas com atividade antimicrobiana que podem afetar alguns membros da microbiota, presentes nessas VE (Rasmussen et al., 2020). Em um estudo de Ott et al, de 2017, com transplante de fezes filtradas estéreis no tratamento de IrCD houve resolução da doença nos 5 pacientes tratados, com modificação do padrão microbiano e viral (Ott et al., 2017). É provável que componentes da parede celular bacteriana ou fragmentos de DNA estimulem a resposta imune através dos RRP, outra possibilidade é de ação dos bacteriófagos ou transferência de bactérias específicas tendo no seu genoma fagos temperados que se tornam ativos após o transplante. Em experimento de He et al., (2019), onde comparou quatro formas de administração do TMF em modelo experimental de colite em camundongos, entre elas uma com as fezes fervidas para esterilização, houve um efeito muito superior do TMF por suspensão do que das fezes esterilizadas, em todos os parâmetros avaliados. Entre esses a inibição da rota TLR4-MyD88-TRAF60-NF κ B, diminuição da lesão da barreira mucosa na histologia, e da expressão de interleucinas (He et al., 2019). O TFE demonstrou no nosso experimento resultados muito

semelhantes ao TMF na prevenção da ECN, da mesma maneira que em outros experimentos com TVF, e melhor com conteúdo fecal fervido. Seria importante a análise de bactérias e vírus viáveis por sequenciamento genético em todos esses modelos para identificar o mais eficiente.

Por fim, vale ressaltar que o TMF ainda é uma terapia sob investigação do FDA (*United States Food and Drug Administration*) devido a complexidade do procedimento e o risco a que leva ao paciente, embora a segurança e tolerância do TMF já tenham sido relatadas em adultos (Gurram et al., 2019; Nowak et al., 2019) e em crianças (Gurram et al., 2019), inclusive em ensaio clínico randomizado conduzido recentemente (Xu et al., 2021). Uma limitação importante é a necessidade de suspensão de antibióticos, principalmente em pacientes críticos (Zeng et al., 2019; Keskey et al., 2020). Os índices de complicação do FMT no tratamento de irCD são baixos, mas casos de morte por aspiração, megacólon tóxico, e recentemente, o desenvolvimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas foram descritos (Zeng et al., 2019; Mullish et al., 2019; Keskey et al., 2020; Adelman et al., 2020; Rasmussen et al., 2020). De uma maneira similar, houve um relato recente de seis casos de pacientes adultos tratados em UTI que desenvolveram bacteremia por *Lactobacillus* após uso de probióticos (Keskey et al., 2020). A regulamentação ainda permanece controversa, mas dois estudos mostraram que pacientes declararam estar dispostos a receber TMF se fosse indicação médica (Kahn et al., 2012; Zipursky et al., 2012). O TMF demonstrou em outros experimentos em modelos suínos, prevenir a ECN e melhorar a eficácia do tratamento com antibióticos, contudo também houve aumento da mortalidade devido a supercrescimento bacteriano (Rasmussen et al., 2020), demonstrando o risco dessa abordagem no prematuro vulnerável.

6. CONCLUSÃO

Os resultados dessa pesquisa têm mostrado que ambas abordagens do TMF (fresco ou estéril) apresentam resultados bastante semelhantes na prevenção da ECN. Surpreendentemente, o TFE possui efeitos significativos quando comparado ao uso de probióticos. Baseado nos resultados obtidos, o método de esterilização proposto, simples e eficaz, propõem tornar o tratamento mais seguro para aplicação clínica na patologia. Sendo assim, a esterilização do TMF pode ser uma estratégia interessante para as doenças que se beneficiam do seu uso, trazendo segurança e mantendo a eficácia do tratamento.

REFERÊNCIAS

- Adelman MW, Woodworth MH, Langelier C, Busch LM, Kempker JA, Kraft CS, Martin GS. The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis. *Crit Care*. 2020 Jun 1;24(1):278.
- Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; (3):CD005496.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier DL, Yamada T, Mende DR, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473(7346), 174–180
- Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ* 2013;185(5):385-394
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:15718–15723.
- Barbut F, Collignon A, Butel MJ, Bourlioux P. Le transfert de flore digestive: une revue de la littérature [Fecal microbiota transplantation: review]. *Ann Pharm Fr*. 2015 Jan;73(1):13-21.
- Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis - the importance of breast milk. *J Pediatr Surg*. 1974; 9:587-95.
- Belizario JE. In “Microbioma, disbiose, probióticos e bacterioterapia”. Ed Joel Faintuch. Barueri, SP, Editoria Manole Ltda, 2017.
- Benkoe T, Reck C, Pones M, Weninger M, Gleiss A, Stift A, Rebhandl W. Interleukin-8 predicts 60-day mortality in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:385–9.
- Benkoe TM, Mechtler TP, Weninger M, Pones M, Rebhandl W, Kasper DC. Serum levels of interleukin-8 and gut-associated biomarkers in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:1446–51.
- Berg D, Clemente JC, Colombel JF. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 9(6):781-95.
- Bergholz R, Zschiegner M, Eschenburg G, et al. Mucosal loss with increased expression of IL-6, IL-8, and COX-2 in a formula-feeding only neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2013; 48:2301–7.
- Berrington JE, Stewart CJ, Cummings SP, Embleton ND. The neonatal bowel microbiome in health and infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2014; 27:236–43.
- Besner GE. A pain in the NEC: Research challenges and opportunities. *J Pediatr Surg*. 2015; 50:23–9.

- Biouss G, Antounians L, Li B, et al. Experimental necrotizing enterocolitis induces neuroinflammation in the neonatal brain. *J Neuroinflammation*. 2019 May 10;16(1):97.
- Björkström MV, Hall L, Söderlund S, Håkansson EG, Håkansson S, Domellöf M. Intestinal flora in very low-birth weight infants. *Acta Paediatr*. 2009; 98(11):1762-7.
- Brunse A, Deng L, Pan X, Hui Y, Kot W, Nguyen DC, Secher JB, Nielsen DS, Thymann T. Fecal filtrate transfer protects against necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *bioRxiv* 2020.05.25.114751.
- Burke KE, Lamont JT. Fecal transplantation for recurrent clostridium difficile infection in older adults: A review. *J Am Geriatr Soc*. 2013; 61(8):1394-8.
- Burrello C, Garavaglia F, Cribiù FM, et al. Therapeutic faecal microbiota transplantation controls intestinal inflammation through IL10 secretion by immune cells. *Nat Commun*. 2018 Dec 5;9(1):5184.
- Chen R, Xu Y, Wu P, et al. Transplantation of fecal microbiota rich in short chain fatty acids and butyric acid treat cerebral ischemic stroke by regulating gut microbiota. *Pharmacol Res*. 2019 Oct; 148:104403.
- Choi HH, Cho YS. Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc* 2016;49(3):257-265.
- Coran, AG. *Pediatric Surgery - Seventh Edition: Necrotizing Enterocolitis*. Philadelphia: Elsevier 2012, 1187-1207.
- Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012;13(10):701.
- Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome–gut– brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol. Motil* 2011; 23, 187–192
- Dasopoulou M, Briana DD, Boutsikou T, Karakasidou E, Roma E, Costalos C, Malamitsi-Puchner A. Motilin and gastrin secretion and lipid profile in preterm neonates following prebiotics supplementation: a double-blind randomized controlled study. *J Parenter Enteral Nutr*. 2015; 39:359–68.
- De Souza, JCK. *Cirurgia pediátrica – teoria e prática: Enterocolite Necrosante*. São Paulo: Editora Roca 2008, 75c, 385-97p.
- Di Mauro A, Neu J, Riezzo G et al. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr*. 2013; Feb 24; 39:15
- Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108:3047–3052.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186:421–31.

- Draper LA, Ryan FJ, Dalmaso M, Casey PG, McCann A, Velayudhan V, Ross RP, Hill C. Autochthonous faecal viral transfer (FVT) impacts the murine microbiome after antibiotic perturbation. *BMC Biol.* 2020 Nov 20;18(1):173.
- Dukleska K, Devin CL, Martin AE, Miller JM, Sullivan KM, Levy C, Prestowitz S, Flathers K, Vinocur CD, Berman L. Necrotizing enterocolitis totalis: High mortality in the absence of an aggressive surgical approach. *Surgery.* 2019 Jun;165(6):1176-1181.
- Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mhlahkoiv T, Jakobshagen K, Buch T, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.* 2015; 18:965–977.
- Feng J, Assal ONE, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor–like growth factor reduces intestinal apoptosis in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2006; 41:742–47.
- Feng J, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor–like growth factor promotes enterocyte migration and proliferation in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2007; 42:214– 20.
- Filip M, Tzaneva V, Dumitrascu DL. Fecal transplantation: digestive and extradigestive clinical applications. *Clujul Medical* 2018; 91(3):259-265.
- Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.* 2017;20:145–155.
- Ganguli K, Collado MC, Rautava J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatr Res.* 2015;77:528-35.
- Ganguli K, Meng D, Rautava S, Lu L, Walker WA, Nanthakumar N. Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;304:G132-41.
- Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity.* 2011;34:794–806.
- Gladwin, David J. Hackam. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS–NO–nitrite signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(23): 9451–9456.
- Goldstein GP, Sylvester KG. Biomarker Discovery and Utility in Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2019 Mar;46(1):1-17.
- Good M, Siggers RH, Sodhi CP, et al. Amniotic fluid inhibits Toll-like receptor 4 signaling in the fetal and neonatal intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:11330-5
- Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology* 2011; 2, 94
- Gurram B, Sue PK. Fecal microbiota transplantation in children: current concepts. *Curr Opin Pediatr* 2019;31(5):623–9.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd. Oxford, London, 1999.
- He Canxia, Shan Yujuan, Song Wei, Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutrition Research*. 2015; 35(5):361-7.
- He Y, Li X, Yu H, Ge Y, Liu Y, Qin X, Jiang M, Wang X. The Functional Role of Fecal Microbiota Transplantation on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Nov 15;9:393.
- Heinzerling NP, Liedel JL, Welak SR, Fredrich K, Biesterveld BE, Pritchard Jr KA, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase is protective to the preterm rat pup intestine. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:954–60.
- Hickey M, Georgieff M, Ramel S. Neurodevelopmental outcomes following necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2018 Dec;23(6):426-432.
- Hoban AE, Stilling RM, Ryan FJ, Shanahan F, Dinan TG, Claesson MJ, Clarke G, Cryan JF. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Transl Psychiatry* 2016;6:e774
- Högberg N, Stenbäck A, Carlsson PO, Wanders A, Lilja HE. Genes regulating tight junctions and cell adhesion are altered in early experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2013; 48:2308–12.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001; 291:881–884.
- Hudson LE, Anderson SE, Corbett AH, Lamb TJ. Gleaning Insights from Fecal Microbiota Transplantation and Probiotic Studies for the Rational Design of Combination Microbial Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Jan;30(1):191-231.
- Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002; 20:197–216.
- Jayasinghe TN, Chiavaroli V, Holland DJ, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The New Era of Treatment for Obesity and Metabolic Disorders: Evidence and Expectations for Gut Microbiome Transplantation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 19:6-15.
- Jenke AC, Postberg J, Mariel B, Hensel K, Foell D, Däbritz J, Wirth S. S100A12 and hBD2 correlate with the composition of the fecal microflora in elbw infants and expansion of *E. coli* is associated with NEC. *Biomed Res Int*. 2013; 150372.
- Kahn SA, Gorawara-Bhat R, Rubin DT. Fecal bacteriotherapy for Ulcerative colitis: patients are ready, are we? *Inflamm. Bowel Dis*. 2012; 18: 676–84.
- Karadag A, Ozdemir R, Kurt A, Parlakpinar H, Polat A, Vardi N, Taslidere E, Karaman A. Protective effects of dexpanthenol in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2015; 50:1119–24.
- Kellermayer R. Fecal microbiota transplantation: great potential with many challenges. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019; 4:40.

- Keskey R, Cone JT, DeFazio JR, Alverdy JC. The use of fecal microbiota transplant in sepsis. *Transl Res.* 2020 Dec; 226:12-25.
- Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Sep;13(9):508-16.
- Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, Konturek SJ, Koziel J. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J Physiol Pharmacol.* 2015; 66(4):483-91.
- Lee I, Neil JJ, Huettner PC, Smyser CD, Rogers CE, Shimony JS, et al. The impact of prenatal and neonatal infection on neurodevelopmental outcomes in very preterm infants. *J Perinatol.* 2014; 34:741–7.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464–78.
- Li J, Wu J, Du L, Hu Y, Yang X, Mu D, Xia B. Different antibiotic strategies in transient tachypnea of the newborn: an ambispective cohort study. *Eur J Pediatr.* 2015; 174(9):1217-23.
- Li X, Li X, Shang Q, Gao Z, Hao F, Guo H, Guo C. Fecal microbiota transplantation (FMT) could reverse the severity of experimental necrotizing enterocolitis (NEC) via oxidative stress modulation. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jul;108:32-43.
- Lin HC, Hsu CH, Chen HL, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 2008; 122:693-700.
- Liu J, Li Y, Feng Y, et al. Patterned progression of gut microbiota associated with necrotizing enterocolitis and late onset sepsis in preterm infants: a prospective study in a Chinese neonatal intensive care unit. *PeerJ* 2019;7:e7310-e.
- Liu J, Miyake H, Zhu H, Li B, Alganabi M, Lee C, Pierro A. Fecal microbiota transplantation by enema reduces intestinal injury in experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2020 Jun;55(6):1094-1098.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–75.
- Luczynski P, McVey Neufeld KA, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2016;19:pyw020
- Maretta M, Tóth S, Jonecová Z, Veselá J. Impact of alanyl-glutamine dipeptide on proliferative and inflammatory changes in jejunal mucosa after acute mesenteric ischemia. *J Pediatr Surg.* 2014; 49:1385–9.
- Martinez KB, Leone V, Chang EB. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function. *J. Biol. Chem.* 2017; 292:8553–8559.

- Matei A, Montalva L, Goodbaum A, Lauriti G, Zani A. Neurodevelopmental impairment in necrotising enterocolitis survivors: systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2020 Jul;105(4):432-439.
- Matheson PJ, Walker SK, Maki AC, Shaheen SP, Garrison RN, Downard CD. Oral relaxin maintains intestinal blood flow in a rat model of NEC. *J Pediatr Surg.* 2014; 49:961–5.
- Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest.* 2015; 125:926–938.
- Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Rev. Neurosci.* 2011; 12, 453–466
- Mishima Y, Oka A, Liu B, et al. Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10-producing regulatory B cells. *J Clin Invest.* 2019 Jun 18;129(9):3702-3716.
- Mollen KP, Gripar SC, Anand RJ, et al. Increased expression and internalization of the endotoxin coreceptor CD14 in enterocytes occur as an early event in the development of experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2008; 43:1175–81.
- Mullish BH, McDonald JAK, Pechlivanis A, et al. Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Gut.* 2019 Oct;68(10):1791-1800.
- Neu J. Necrotizing enterocolitis: the mystery goes on. *Neonatology* 2014;106(4): 289–95.
- Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 2011; 23:255–264: e119.
- Nicholson MR, Mitchell PD, Alexander E, et al. Efficacy of Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection in Children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019; pii: S1542-3565(19)30427-6.
- Niemarkt HJ, De Meij TG, van Ganzewinkel CJ, de Boer NKH, Andriessen P, Hütten MC, Kramer BW. Necrotizing Enterocolitis, Gut Microbiota, and Brain Development: Role of the Brain-Gut Axis. *Neonatology.* 2019;115(4):423-431.
- Niño DF, Zhou Q, Yamaguchi Y, et al. Cognitive impairments induced by necrotizing enterocolitis can be prevented by inhibiting microglial activation in mouse brain. *Sci Transl Med.* 2018 Dec 12;10(471).
- Nowak A, Hedenstierna M, Ursing J, et al. Efficacy of routine fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection: a retrospective cohort study. *Int J Microbiol* 2019; 2019:7395127.
- Ogbonnaya ES, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, O’Leary OF. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. *Biol. Psychiatry.* 2015; 78:e7–e9.
- Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, et al. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology.* 2017 Mar;152(4):799-811.e7.

- Özdemir OMA, Ergin H, Yenisey C, Türk NS. Protective effects of Ginkgo biloba extract in rats with hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *J Pediatr Surg.* 2011; 46:685–90.
- Ozdemir R, Yurttutan S, Sari FN, et al. Antioxidant effects of N-acetylcysteine in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2012; 47:1652–7.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011; 333:1456–1458.
- Papanicolas LE, Choo JM, Wang Y, Leong LEX, Costello SP, Gordon DL, Wesselingh SL, Rogers GB. Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine.* 2019 Mar;41:509-516.
- Park H, Laffin MR, Jovel J, Millan B, Hyun JE, Hotte N, Kao D, Madsen KL. The success of fecal microbial transplantation in *Clostridium difficile* infection correlates with bacteriophage relative abundance in the donor: a retrospective cohort study. *Gut Microbes.* 2019;10(6):676-687.
- Patole S, Keil AD, Chang A, Nathan E, Doherty D, Simmer K, Esvaran M, Conway P. Effect of Bifidobacterium breve m-16v supplementation on fecal bifidobacteria in preterm neonates - a randomised double blind placebo controlled trial. *PLoS ONE.* 2014; 9(3):e89511.
- Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol. Aging.* 2008; 29:1754–1762.
- Perrone EE, Chen C, Longshore SW, Okezie O, Warner BW, Sun CC, Alaish SM, Strauch ED. Dietary bile acid supplementation improves intestinal integrity and survival in a murine model. *J Pediatr Surg.* 2010; 45:1256–65.
- Prado C, Michels M, Ávila P, Burger H, Milioli MVM, Dal-Pizzol F. The protective effects of fecal microbiota transplantation in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2019;54(8):1578-1583.
- Quraishi MN, Shaheen W, Oo YH, Iqbal TH. Immunological mechanisms underpinning faecal microbiota transplantation for the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2020 Jan;199(1):24-38.
- Radulescu A, Yu X, Orvets ND, Chen Y, Zhang HY, Besner GE. Deletion of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene increases susceptibility to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surger.* 2010; 45:729–34.
- Radulescu A, Zhang HY, Yu X, Olson JK, Darbyshire AK, Chen Y, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor overexpression in transgenic mice increases resistance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2010; 45:1933–9.
- Rasmussen TS, Koefoed AK, Jakobsen RR, et al. Bacteriophage-mediated manipulation of the gut microbiome - promises and presents limitations. *FEMS Microbiol Rev.* 2020 Jul 1;44(4):507-521.

- Rentea RM, Liedel JL, Fredrich K, Pritchard Jr K, Oldham KT, Simpson PM, Gourlay DM. Enteral intestinal alkaline phosphatase administration in newborns decreases iNOS expression in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 2013; 48:124–8.
- Rentea RM, Liedel JL, Welak SR, et al. Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 2012; 47:1135–42.
- Repa A, Thanhaeuser M, Endress D, Weber M, Kreissl A, Binder C, Berger A, Haiden N. Probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis*) prevent NEC in VLBW infants fed breast milk but not formula [corrected]. *Pediatr Res.* 2015;77:381-8
- Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2009; 6, 306–314
- Rich BS, Dolgin SE. Necrotizing Enterocolitis. *Pediatr Rev.* 2017 Dec;38(12):552-559.
- Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, Mazmanian SK. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science.* 2011; 332:974–977.
- Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11:775–787.
- Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* 2017; 23:1018–1027.
- Seekatz AM, Theriot CM, Molloy CT, Wozniak KL, Bergin IL, Young VB. Fecal Microbiota Transplantation Eliminates *Clostridium difficile* in a Murine Model of Relapsing Disease. *Infect Immun.* 2015; 83(10):3838-46.
- Sharif S, Meader N, Oddie SJ, Rojas-Reyes MX, McGuire W. Probiotics to prevent necrotising enterocolitis in very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Oct 15;10(10):CD005496.
- Shin SH, Kim EK, Yoo H, et al. Surgical necrotizing enterocolitis versus spontaneous intestinal perforation in white matter injury on brain magnetic resonance imaging. *Neonatology.* 2016;110:148–54.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:483–495.
- Sim K, Shaw AG, Randell P, et al. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clinical Infec Dis.* 2015; 60(3):389–97.
- Stewart CJ, Marrs ECL, Nelson A, et al. Development of the preterm gut microbiome in twins at risk of necrotising enterocolitis and sepsis. *PLoS ONE.* 2013; 8(8):e73465.
- Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. Microbial genes, brain e behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain and Behavior* 2014; 13(1), 69–86

- Strati F, Pujolassos M, Burrello C, Giuffrè MR, Lattanzi G, Caprioli F, Troisi J, Facciotti F. Antibiotic-associated dysbiosis affects the ability of the gut microbiota to control intestinal inflammation upon fecal microbiota transplantation in experimental colitis models. *Microbiome*. 2021 Feb 6;9(1):39.
- Sun X, Winglee K, Gharaibeh RZ, et al. Microbiota-Derived Metabolic Factors Reduce *Campylobacteriosis* in Mice. *Gastroenterology*. 2018 May;154(6):1751-1763.e2.
- Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56 Suppl 4:S44-9.
- Tatum Jr PM, Harmond CM, Lorenz RG, Dimmitt RA. Toll-like receptor 4 is protective against neonatal murine ischemia-reperfusion intestinal injury. *J Pediatr Surg*. 2010; 45:1246–55.
- Torrazza RM, Ukhanova M, Wang X, Sharma R, Hudak ML, Neu J, Mai V. Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE*. 2013; 8(12): e83304.
- Torres AE, Lyons AB, Narla S, Kohli I, Parks-Miller A, Ozog D, Hamzavi IH, Lim HW. Ultraviolet-C and other methods of decontamination of filtering facepiece N-95 respirators during the COVID-19 pandemic. *Photochem Photobiol Sci*. 2020 May 15.
- Valverde JR, Mellado RP. Analysis of metagenomic data containing high biodiversity levels. *PLoS One*. 2013;8(3):e58118.
- van Druten J, Khashu M, Chan SS, Sharif S, Abdalla H. Abdominal ultrasound should become part of standard care for early diagnosis and management of necrotising enterocolitis: a narrative review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2019 Sep;104(5):F551-F559.
- Walker WA. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. *Pediatr Res*. 2017 Sep;82(3):387-395.
- Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, et al. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J*. 2009; 3(8):944-54.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013; 496:445–455.
- Xavier AL, Menezes JRL, Goldman SA, Nedergaard M. Fine-tuning the central nervous system: microglial modelling of cells and synapses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 2014; 369:20130593.
- Xu F, Li N, Wang C, Xing H, Chen D, Wei Y. Clinical efficacy of fecal microbiota transplantation for patients with small intestinal bacterial overgrowth: a randomized, placebo-controlled clinic study. *BMC Gastroenterol*. 2021 Feb 6;21(1):54.
- Yarandi SS, Peterson DA, Treisman GJ, Moran TH, Pasricha PJ. Modulatory effects of gut microbiota on the central nervous system: how gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2016; 22(2), 201–212

Yazji I, Sodhi CP, Lee EK, et al. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 4;110(23):9451-6.

Yoo BB, Mazmanian SK. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*. 2017; 46:910–926.

Yu Y, Klemann C, Feng X, Ginzel M, Vieten G, Lacher M, Ure B, Kuebler JF. Increased inflammatory reaction to intestinal ischemia-reperfusion in neonatal versus adult mice. *Eur J Pediatr Surg*. 2015; 25:46–50.

Zeng W, Shen J, Bo T, Peng L, Xu H, Nasser MI, Zhuang Q, Zhao M. Cutting Edge: Probiotics and Fecal Microbiota Transplantation in Immunomodulation. *J Immunol Res*. 2019 Apr 16;2019:1603758.

Zhou W, Li W, Zheng XH, Rong X, Huang LG. Glutamine downregulates TLR-2 and TLR-4 expression and protects intestinal tract in preterm neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:1057–63.

Zipursky JS, Sidorsky TI, Freedman CA, Sidorsky MN, Kirkland KB. Patient attitudes toward the use of fecal microbiota transplantation in the treatment of recurrent clostridium difficile infection. *Clin. Infect. Dis*. 2012; 55: 1652–8.

ANEXO 1 – Parecer aprovado da Comissão de Ética de uso de Animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

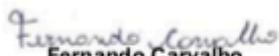
Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **06/10/2020**.

Título do projeto	Análise comparativa entre transplante de microbioma fecal congelado ou estéril em modelo experimental de enterocolite necrosante neonatal
Project title	Comparative analysis between frozen or sterile fecal microbiome transplantation in an experimental model of neonatal necrotizing enterocolitis
Número do protocolo Protocol number	68/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	Felipe Dal-Pizzol
Pesquisadores Researchers	Christian Prado, Monique Michels, Mariane Abatti, Andriele Vieira, Emily Cómeo, Rodrigo Dias, Filipe Fernandes Gabriel, Amanda Indalécio Goulart, Filipe Fernandes Gabriel e Natalli Studnicka.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/10/2020 a 10/10/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Idade/Peso	1 dia / 20-30g
Número de animais	Masculino = 90
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Idade/Peso	2 meses / 200-300g
Número de animais	Masculino = 1
Total	91
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 06 de outubro de 2020.


Fernando Carvalho
Coordenador da CEUA