



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA – UNIARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

ALDO RODRIGUES BARBUGLI FILHO

PROCESSO DE ELEIÇÃO, SELEÇÃO, ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DE
FEZES CANINAS, VISANDO O TRANSPLANTE FECAL EM PACIENTES
PORTADORES DE ATOPIA E ENTEROPATIAS

ARARAQUARA - SP

2025

Aldo Rodrigues Barbugli Filho

PROCESSO DE ELEIÇÃO, SELEÇÃO, ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DE
FEZES CANINAS, VISANDO O TRANSPLANTE FECAL EM PACIENTES
PORTADORES DE ATOPIA E ENTEROPATIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof^a Dr^a CREUSA SAYURI TAHARA AMARAL
Co-orientadora: Prof^a Dr^a ELIANE TROVATTI

ARARAQUARA - SP

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

B215p Barbugli Filho, Aldo Rodrigues.
Processo de eleição, seleção, armazenamento e conservação de fezes caninas visando o transplante fecal em pacientes portadores de atopia e enteropatias/Aldo Rodrigues Barbugli Filho. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.
148f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Creuza Sayuri Tahara Amaral

1. Transplante fecal. 2. Microbiota. 3. Disbiose em cães. 4. Terapêutica microbiana. 5. Banco de fezes caninas. I. Título.

CDU 57.089


ALDO RODRIGUES BARBUGLI FILHO

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.


Araraquara, 28 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA


Prof^ª Dr^ª CREUSA SAYURI TAHARA AMARAL (Orientadora)
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 CREUSA SAYURI TAHARA AMARAL
Data: 05/12/2025 13:38:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 LUIS HENRIQUE MONTREZOR
Data: 05/12/2025 11:08:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. FLÁVIO HENRIQUE DA SILVA
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Documento assinado digitalmente
 FLAVIO HENRIQUE DA SILVA
Data: 05/12/2025 10:09:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª Dr^ª LIGIA MARIA NEIRA
Centro Universitário Central Paulista de São Carlos – UNICEP

Documento assinado digitalmente
 LIGIA MARIA NEIRA RODRIGUES
Data: 03/12/2025 13:47:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^ª REGIANE DE FÁTIMA TRAVENSOLO
Agência de Inovação da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Documento assinado digitalmente
 REGIANE DE FATIMA TRAVENSOLO
Data: 02/12/2025 18:18:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

A ciência não é apenas um corpo de conhecimentos, mas uma maneira de pensar, um modo de questionar ardentemente o desconhecido, desafiando o impossível com determinação incansável.

Carl Sagan

Dedico este trabalho a todos os tutores de cães e gatos que zelam pelo bem-estar de seus animais com responsabilidade, discernimento e amor. De modo especial, àqueles que depositaram e continuam a depositar em mim a confiança no cuidado da saúde de seus estimados animais de companhia.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha mais sincera gratidão à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Creusa Sayuri Tahara Amaral, pela confiança depositada em meu trabalho e proposta de pesquisa. Sua orientação dedicada, apoio constante e generosidade intelectual foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese e para meu crescimento acadêmico e pessoal.

À minha família, registro meu reconhecimento profundo pelo encorajamento contínuo e pelo apoio afetivo incondicional, que foram essenciais em todos os momentos desta trajetória.

Aos tutores dos animais incluídos neste estudo, agradeço pela confiança no tratamento proposto, bem como pela colaboração e dedicação demonstradas ao longo de todo o processo. Sem essa parceria, este trabalho não teria sido possível.

Manifesto ainda meu especial agradecimento ao Dr. Alexandre Rizzo, pelo apoio constante, parceria generosa e pela disponibilidade em contribuir de forma significativa para este percurso acadêmico.

Estendo meus agradecimentos a todos os colegas e integrantes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Araraquara (UNIARA), pela convivência enriquecedora, pelo apoio científico e pelas valiosas trocas de conhecimento que muito contribuíram para a realização desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho, deixo aqui minha profunda gratidão.

RESUMO

Animais de companhia (cães e gatos), têm conquistado um lugar especial nos lares, independente da classe social dos tutores. Estes animais são reconhecidos como membros da família, devido ao forte elo afetivo estabelecido na relação homem e animal. Como membros da família, os animais necessitam de todos os cuidados, desde a alimentação e cuidados básicos, até a manutenção da sua saúde. A longevidade dos *pets* é, certamente, uma demanda de grande valor para a sociedade atual. Contudo, algumas doenças crônicas caninas, como dermatites atópicas e gastroenteropatias, que perfazem mais de 50% das rotinas de atendimentos clínicos, não têm bons resultados com os tratamentos convencionais, gerando impacto financeiro, insatisfação e desgaste emocional para os tutores. O potencial de tratamentos e avaliações de saúde baseada no microbioma intestinal é expressivo e já se faz presente da medicina humana. Na veterinária essa conduta também está se desenvolvendo. O objetivo principal deste trabalho é desenvolver um biobanco de fezes caninas, com foco no detalhamento do processo de seleção, armazenamento e conservação de fezes caninas. A constituição do biobanco visa apoiar o Transplante de microbiota fecal (TMF) em pacientes caninos portadores de atopias e enteropatias. O TMF em cães pode ser realizado por meio da infusão retal de soluções biológicas, denominadas enemas, que são previamente manipuladas em laboratório, utilizando uma metodologia adequada de diluição. A pesquisa adotou a seguinte metodologia: estudo da microbiota ideal, seleção de doadores, caracterização e critérios de armazenamento e conservação do enema para a produção de um biobanco de fezes caninas. A seleção dos doadores foi realizada com base na análise do microbioma intestinal, avaliado mediante análises por sequenciamento do gene 16S rRNA, para assegurar o predomínio de espécies comensais desejáveis no perfil bacteriano dos táxons, garantindo assim a eficácia e segurança do procedimento de TMF. Foram selecionados 6 animais como doadores. Os enemas preparados foram armazenados, e 20 pacientes receberam o enema, por três vezes, com dez dias de intervalo entre os transplantes. Todos os animais foram acompanhados por 120 dias e apresentaram melhora significativa, sem eventos adversos. A pronta oferta do enema para o transplante é um elemento fundamental para a consolidação da terapia de TMF, por garantir a segurança e a disponibilidade do enema, que atenda a demanda. O biobanco de fezes caninas, até onde sabemos, o primeiro a ser constituído no Brasil, é uma forma de viabilizar o tratamento de dermatites e enteropatias crônicas em cães, por meio do TMF e permite sua expansão como opção terapêutica.

Palavras-chave: Transplante fecal. Microbiota. Disbiose em cães. Terapêutica microbiana. Biobanco de fezes caninas.

ABSTRACT

Companion animals (dogs and cats) have earned a special place in households, regardless of the tutors' social class. These animals are recognized as members of the family due to the strong emotional bond established in the human–animal relationship. As family members, animals require comprehensive care—from nutrition and basic management to the maintenance of their health. The longevity of pets is certainly a matter of great importance to contemporary society. However, some chronic canine diseases, such as atopic dermatitis and gastroenteropathies—which account for more than 50% of routine clinical consultations—often do not respond well to conventional treatments, leading to financial impact, dissatisfaction, and emotional strain for tutors. The potential of health assessments and treatments based on the intestinal microbiome is considerable and already well established in human medicine. In veterinary medicine, this approach is also under active development. The objective of this study is to develop a **canine fecal biobank**, focusing on detailing the process of selection, storage, and preservation of canine fecal samples. The establishment of the biobank aims to support **Fecal Microbiota Transplantation (FMT)** in canine patients affected by atopic and enteropathic conditions. FMT in dogs can be performed through the rectal infusion of biological solutions, known as enemas, which are previously prepared in the laboratory using an appropriate dilution methodology. The research adopted the following methodology: study of the ideal microbiota, donor selection, characterization, and definition of storage and preservation criteria for the enema, aiming at the production of a canine fecal biobank. Donor selection was based on the analysis of the intestinal microbiome, assessed through sequencing of the 16S rRNA gene, in order to ensure the predominance of desirable commensal species within the bacterial taxonomic profile, thereby guaranteeing the efficacy and safety of the FMT procedure. Six animals were selected as donors. The prepared enemas were stored, and twenty patients received the enema three times, with ten-day intervals between transplants. All animals were monitored for 120 days and showed significant improvement without adverse events. The prompt availability of the enema for transplantation is a key element for the consolidation of FMT therapy, as it ensures both the safety and the readiness of the biological material to meet clinical demand. The **canine fecal biobank**, the first to be established in Brazil, represents an important means of enabling the treatment of chronic dermatitis and enteropathies in dogs through FMT, and allows for its expansion as a therapeutic option.

Keywords: Fecal transplantation. Microbiota. Dysbiosis in dogs. Microbial therapy. Canine fecal biobank.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCCs – *Short Chain fatty acids* – ácidos graxos de cadeia curta
- BSS – *Bristol Stool Scale* – Escala de Fezes de Bristol
- DCs – *Dendritic cells* – Células dentríticas
- DII – Doença inflamatória intestinal
- FDA – *Food and Drug Administration* é uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos
- GIM – *Gastrointestinal Microbiota* - Microbiota Gastrointestinal
- MGBA – *Microbiota-Gut-Brain Axis* – Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro
- RBS – *Systematic review* – Revisão bibliográfica sistemática
- SIBIO – *Small intestinal bacterial overgrowth*
- TMF – Transplante de microbiota fecal

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo da fundamentação teórica.....	42
Quadro 2: Aspectos físicos e de umidade para a escala de Bristol.....	50
Quadro 3: Análises bioquímicas dos doadores.....	63
Quadro 4: Resultados dos exames de ultrassom realizados nos doadores.....	65
Quadro 5: Doadores aprovados, IMC e % de gordura.....	68
Quadro 6: Resultados encontrados nos doadores.....	71
Quadro 7: Valores de umidade de fezes frescas coletadas em 10 amostras.....	71
Quadro 8: Avaliação do congelamento.....	76
Quadro 9: Resultados do painel microbiológico das fezes dos doadores. Exames realizados no laboratório de gastrologia veterinário Stonewell, segundo painel de disbiose da A&M Texas.....	77
Quadro 10: Bactérias desejáveis e indesejáveis predominantes por espécie.....	79
Quadro 11: Receptores com injúrias dermatológicas.....	86
Quadro 12: Receptores com injúrias gastrointestinais.....	87
Quadro 13: Resumo dos objetivos específicos e as evidências.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do desenvolvimento do biobanco de fezes caninas	24
Figura 2: Resumo das principais ocorrências bioquímicas oriundas da ação de bactérias desejáveis no intestino	35
Figura 3: Ação das bactérias no intestino pós-transplante fecal	37
Figura 4: Práticas necessárias para atender as demandas do MAPA para Biobanco	41
Figura 5: Fluxograma de revisão sistemática, de acordo com o protocolo PRISMA.....	46
Figura 6: Rede formada com as palavras-chave utilizadas na busca	46
Figura 7: Demonstrativo dos cálculos de IMC e % gordura corporal	50
Figura 8: Sistema de <i>score</i> fecal para cães.....	51
Figura 9: Processo de preparação e armazenamento dos enemas fecais	52
Figura 10: Ilustração do tranplante fecal em cães	53
Figura 11: Quatro fichas de acompanhamento clínico foram preenchidas mensalmente.....	58
Figura 12: Processo analítico taxonômico das bactérias - Plataforma de sequenciamento 16S rRNA .	60
Figura 13: Método de Bioinformática – Basecall e Demultiplex.....	61
Figura 14: Processo de seleção dos cães doadores	66
Figura 15: Demonstrativo dos cálculos de IMC e % gordura corporal	67
Figura 16: Doadores Lorraine(A) e Bhor(B).....	68
Figura 17: <i>Score</i> corporal canino.....	69
Figura 18: Preparação e armazenamento das amostras fecais antes da finalização dos enemas.	70
Figura 19: Fezes do doador caracterizado como tipo 5	71
Figura 20: Resultado de mensuração dos enemas.....	73
Figura 21: Gráfico de viscosidade.....	73
Figura 22: Imagem comparativa entre o enema e o composto mimetizado após 5 minutos no agitador a 10 RPM	75
Figura 23: Processo de coleta das fezes, preparação, armazenamento e envio do enema fecal.....	85
Figura 24: Resumo do procedimento experimental	88
Figura 25: Box-plots para as bactérias presentes no grupo gastroenterológicos.....	91
Figura 26: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Clostridium Hiranonis</i> dos pacientes.....	93
Figura 27: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Clostridium perfringens</i> dos pacientes.....	94
Figura 28: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Blautia hansenii</i> dos pacientes	94
Figura 29: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Faecalimonas umbilicata</i> dos pacientes ..	95
Figura 30: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Clostridium disporicum</i> dos pacientes	95
Figura 31: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Enterococcus faecalis</i> dos pacientes.....	96
Figura 32: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Escherichia coli</i> dos pacientes.....	97
Figura 33: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Blautia glucerosea</i> dos pacientes	97
Figura 34: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Ruminococcus gnavus</i> dos pacientes.....	98
Figura 35: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Terrisporobacter mayombei</i> dos pacientes	99
Figura 36: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Streptococcus lutetiensis</i> dos pacientes....	99
Figura 37: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Staphylococcus felis</i> dos pacientes	100
Figura 38: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Streptococcus lutetiensis</i> dos pacientes..	101
Figura 39: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>Enterobacter cancerogenus</i> dos pacientes	101
Figura 40: Resultados clínicos longitudinais de pacientes gastro	103
Figura 41: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias desejáveis</i> dos pacientes	105

Figura 42: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias indesejáveis</i> dos pacientes	106
Figura 43: Gráficos Box Plots – Pacientes dermató: as espécies de bactérias desejáveis: <i>Clostridium hiranonis</i> , <i>Blautia hansenii</i> , <i>Blautia gluceracea</i> , estiveram presentes em maiores e crescentes proporções nas amostras analisadas pós 60 dias do transplante realizado no grupo dos doentes dermató.....	108
Figura 44: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias Clostridium hiranonis</i> dos pacientes	110
Figura 45: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Clostridium perfringen</i> dos pacientes	110
Figura 46: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Blautia hansenii</i> dos pacientes	111
Figura 47: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Faecalimonas umbilicata</i> dos pacientes	112
Figura 48: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Clostridium disporicum</i> dos pacientes	112
Figura 49: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Enterococcus faecalis</i> dos pacientes	113
Figura 50: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Escherichia coli</i> dos pacientes	114
Figura 51: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Blautia glucerasea</i> dos pacientes	114
Figura 52: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias Ruminococcus gnavus</i> dos pacientes	115
Figura 53: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias Terrisporobacter mayombeii</i> dos pacientes	116
Figura 54: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias <i>Streptococcus lutetiensis</i> dos pacientes	116
Figura 55: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias Staphylococcus felis</i> dos pacientes	117
Figura 56: Comparação de Fisher 95% entre as médias de <i>bactérias Enterobacter cancerogenus</i> dos pacientes	118
Figura 57: Resultados clínicos longitudinais de pacientes dermató	119
Figura 58: Gráfico bactérias desejáveis no grupo dermató, mostrando diferenças significativas na comparação antes, e 30 e 60 dias após	121
Figura 59: Gráfico bactérias indesejáveis no grupo dermató, mostrando diferenças significativas na comparação antes, e 30 e 60 dias após	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Score</i> grupo gastro.....	58
Tabela 2: <i>Score</i> grupo dermato.....	58
Tabela 3: Medidas de viscosidade obtidas com desvio padrão de três amostras com temperatura de 30°C.....	74
Tabela 4: Intervalos de referência quantidade de bactérias para cães.....	78
Tabela 5: Níveis nutricionais da dieta dos doadores.....	81
Tabela 6: Consumos individuais diários dos doadores.....	82
Tabela 7: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias dos pacientes gastroentéricos.....	90
Tabela 8: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias desejáveis e indesejáveis para os pacientes gastroentéricos.....	91
Tabela 9: Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias de bactérias antes, 30 e 60 dias após o TMF - Nível de significância ($\alpha = 0,05$).....	92
Tabela 10: Valores nutricionais da dieta dos pacientes do grupo Gastro.....	105
Tabela 11: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias dos pacientes Dermato.....	107
Tabela 12: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias desejáveis e indesejáveis para os pacientes dermato.....	108
Tabela 13: Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias de bactérias antes, 30 e 60 dias após o TMF - Nível de significância ($\alpha = 0,05$) – pacientes dermato.....	109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
1.3 JUSTIFICATIVA	24
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
2.1 MICROBIOTA	28
2.1.1 <i>Disbiose e Simbióticos</i>	29
2.1.2 <i>O fator nutrição na composição da microbiota</i>	30
2.2 DOENÇAS CRÔNICAS ASSOCIADAS AO INTESTINO	31
2.3 TRANSPLANTE FECAL	33
2.3.1 <i>A biotecnologia do transplante fecal para transformação da microbiota dos transplantados</i>	38
2.3.2 <i>Análise taxonômica das bactérias</i>	38
2.4 BIOBANCO	39
2.4.1 <i>Estabelecimento de Biobancos: Diretrizes e Considerações Éticas</i>	39
2.5 SÍNTESE DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA	45
3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	48
3.2.1 <i>Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa Animal</i>	48
3.2.2 <i>Caracterização do doador</i>	48
3.2.2.1 Cálculo do tamanho amostral (n) de doadores	49
3.2.2.2 Características físicas dos doadores	49
3.2.3 <i>Características físicas das fezes do doador</i>	50
3.2.4 <i>Processo de produção e armazenamento do enema fecal</i>	51
3.2.5 <i>Cálculo do tamanho amostral (n) de receptores</i>	53
3.2.5.1 Critérios de inclusão de receptores	54
3.2.5.2 Critérios de exclusão de receptores	54
3.2.6 <i>Controle dos riscos</i>	55
3.2.7 <i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do responsável pelo animal voluntário</i>	56
3.2.8 <i>Planejamento do transplante fecal no animal voluntário</i>	56
3.2.9 <i>Acompanhamento clínico</i>	57
3.2.10 <i>Identificação da microbiota por sequenciamento</i>	59
3.2.11 <i>Análise bioinformática dos dados obtidos</i>	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO DOADOR	62
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS DOADORES	67
4.3 CARACTERÍSTICAS DAS FEZES DO DOADOR	70
4.4 AVALIAÇÃO E RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DO ENEMA FECAL	72
4.4.1 <i>Resultados obtidos de viscosidade do enema</i>	73
4.4.2 <i>Enema fecal mimetizado</i>	74
4.4.2.1 <i>Preparo do enema mimetizado</i>	74
4.5 RESULTADOS DO ARMAZENAMENTO DOS ENEMAS EM ULTRAFREEZER	75
4.6 SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL FECAL DO DOADOR	76
4.7 SOBRE A DIETA DOS DOADORES	80
4.8 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ENEMA FECAL	82
4.9 SELEÇÃO DE RECEPTORES DO TMF	86

4.10 O PROCEDIMENTO DE TRANSPLANTE FECAL.....	87
4.11 GRUPO GASTRO.....	89
4.11.1 <i>Sobre bactérias desejáveis do Grupo Gastro</i>	105
4.11.2 <i>Sobre bactérias indesejáveis do grupo gastro</i>	106
4.12 GRUPO DERMATO	106
4.12.1 <i>Sobre bactérias desejáveis grupo dermató</i>	121
4.12.2 <i>Sobre bactérias indesejáveis no grupo Dermato</i>	122
4.13 SÍNTESE DOS RESULTADOS	123
4.13.1 <i>Análise do clostridium hiranonis pós-transplante</i>	123
4.13.2 <i>Resumo das evidências</i>	123
5 CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICES.....	136

1 INTRODUÇÃO

O mercado de animais de companhia brasileiro deve faturar R\$ 77,2 bilhões em 2025, crescendo 2,42% em relação a 2024, que foi de R\$ 75,4 bilhões. O *pet food* lidera com R\$ 40,82 bilhões (52,9% do total), seguido pela venda de animais (R\$ 8,5 bi), produtos veterinários (R\$ 8,2 bi) e serviços veterinários (R\$ 8,1 bi) (Abempet, 2025). Vale mencionar que o mercado brasileiro é o segundo maior do mundo em faturamento e total de animais, perdendo apenas para os Estados Unidos (Abinpet, 2022). A população de cães e gatos no Brasil ultrapassa 85 milhões de animais, segundo dados da Abinpet, sendo 56 milhões de cães e 25 milhões de felinos. Assim, em média as residências abrigam mais de um animal, o que representa mais de 2,4 animais por família (Abinpet, 2022).

Os dados para o Brasil em 2022 são de mais de 180 mil estabelecimentos veterinários, entre clínicas e hospitais para cães e gatos. Vale citar que a população brasileira, segundo o último censo em 2022, foi estimada em 203,1 milhões de pessoas, assim, temos cerca de 0,4 animais por habitante. Nos Estados Unidos existem mais de 170 milhões de animais, entre cães e gatos, sendo a população de felinos superior a de cães. Com uma população de cerca de 330 milhões de pessoas, os Estados Unidos têm em média 0,50 animais por habitante, valor relativamente próximo ao do Brasil (Abinpet, 2022).

Assim, os animais de companhia (cães e gatos), vêm ocupando espaço crescente e relevante nos lares, são reconhecidos como um membro da família pelo elo afetivo desenvolvido, independente da classe social. Em muitos casos, são eleitos como opção de casais, que optam por não ter filhos. Nesse contexto, a busca por soluções mais eficientes em diversas áreas do mercado pet é crescente, o que resulta no aumento do número de estabelecimentos para venda de produtos e inovações tecnológicas, tanto nos serviços veterinários como hotéis e creches, como em produtos farmacológicos (Abinpet, 2022).

A cadeia *Pet Food* (rações e petiscos), representou 75% do faturamento, seguido por serviços, clínicas, *pet serv*, banho e tosa (18%), e a indústria farmacológica, ao redor de 7,0% (Abinpet, 2022). O mercado de produtos e serviços para cães e gatos tem crescido em média 7% a 12% nos últimos anos.

Este contexto evidencia que a tecnologia terá importância crescente na medicina veterinária, disponibilizando recursos capazes de maximizar a prevenção e

tratamento de doenças agudas e crônicas de forma eficaz. Inovações tecnológicas e biotecnológicas disponíveis, como exames menos invasivos, uso de biomarcadores diagnósticos, maior qualidade e precisão de imagens, videocirurgias, já são realidades nos consultórios veterinários (Barbugli Filho; Amaral; Trovatti, 2024).

Novos fármacos e tratamentos vão possibilitar o prolongamento da vida dos pets com qualidade. A longevidade dos animais de companhia é a estratégia que direciona a medicina veterinária e áreas coligadas (*Healthspan*), como a farmacologia e laboratórios biológicos (Dhaliwal *et al.*, 2023).

Doenças crônicas como insuficiência renal, já possuem tratamentos clínicos e nutricionais, capazes de prolongar a sobrevivência de pacientes críticos com bem-estar e saúde. O mesmo se aplica para a área da oncologia veterinária (Bartges, 2012).

Protocolos avançados para a internação de pacientes críticos estão em constante evolução, e, neste aspecto, diversas áreas seguem em desenvolvimento, com destaque para a nutrologia veterinária de cães e gatos, e os estudos inerentes a biota intestinal. Tratamentos nutricionais enterais e até parenterais já são uma realidade na internação de cães e gatos, e a tendência é seguir com melhorias e mais eficiência nos resultados (Gagne; Wakshlag, 2015). É expressiva a tendência de pesquisas que avançam na área nutricional, distinta do segmento rações (base das pesquisas até então), pois alimentação não convencional, como a natural para cães e gatos, retornam ao mercado apresentando bons resultados (Jericó; Andrade-Neto; Kogika, 2015; Akamine *et al.* 2023).

Algumas enfermidades crônicas caninas como dermatites e enteropatias, perfazem a maioria das casuísticas de atendimento, que somadas, representam mais de 60% dos atendimentos nas rotinas clínicas (Jericó; Andrade-Neto; Kogika, 2015). No entanto, ocorre que os tratamentos vigentes e convencionais não estão gerando resultados satisfatórios (Jericó; Andrade-Neto; Kogika, 2015).

O estudo da biota intestinal em humanos é uma área de pesquisa que vêm crescendo nos últimos 10 anos, pois já existem resultados apontando para soluções impactantes nos tratamentos de disfunções cognitivas como Alzheimer, diabetes, doenças metabólicas, obesidade, tumores de intestino e alergias, por meio do entendimento, até então pouco observado da biota intestinal do paciente, e sua correlação imediata com processos alostáticos e homeostáticos (Wang *et al.*, 2019).

A partir de 1990, a comunidade científica e médica passou a considerar com mais interesse a relação entre o organismo (hospedeiro), e a microbiota intestinal

(Anderson, 2004). As pesquisas estão mostrando que a saúde e longevidade das pessoas dependem das novas descobertas sobre o papel da biota intestinal no organismo (Yang; Millischer, 2020).

Foster *et al.* (2013) apresentam resultados obtidos por meio de transplantes fecais de pacientes sadios para enfermos. Contudo, ainda é incipiente, principalmente no Brasil, o uso de terapias que utilizam dados da microbiota intestinal na medicina veterinária, que deve seguir na busca por terapias inovadoras, por meio do maior entendimento sobre como ocorre o processo de alteração da biota intestinal.

Outras pesquisas já evidenciam resultados positivos no tratamento de dermatites caninas e enteropatias, por meio do transplante fecal (Sugita *et al.*, 2023). Estes estudos corroboram a relevância e a característica inovadora dessa nova abordagem para o tratamento de doenças caninas crônicas, com oportunidade de atender as necessidades de um grande mercado.

As enteropatias crônicas são distúrbios prevalentes em cães, e a maioria dos afetados responde a protocolos de tratamento baseados em evidências (Makielski *et al.*, 2019). No entanto, Nordin *et al.* (2022) demonstraram que aproximadamente 15-43% dos cães com inflamações intestinais crônicas não respondem aos tratamentos convencionais com o uso de antibióticos, existindo um mau prognóstico a longo prazo, e um alto risco de eutanásia.

O TMF, pode determinar significativa mudança na microbiota intestinal, resolvendo de forma sustentada a disbiose. O TMF é usado para transferir o microbiota intestinal de um doador saudável para um receptor doente, a fim de mudar sua microbiota e diminuir a atividade da doença (Suchdolski J.S., 2015).

Sugita *et al.* (2023) sugerem que o transplante de microbiota fecal (TMF), pode ser um tratamento adjuvante promissor, desde que acompanhado de dietas capazes de manter a biota transplantada estável no paciente. Sobre este ponto, espera-se melhor resultado em pacientes alimentados com dietas naturais específicas, e formuladas por nutrólogos experientes.

Estudos de Hoffman *et al.* (2021) afirmam que “o transplante da microbiota fecal pode aumentar a probabilidade de remissão clínica em casos de colite ulcerosa”. Pillar *et al.* (2020) realizaram uma meta-análise que comparou o microbioma intestinal em cães saudáveis *versus* cães com distúrbios gastrointestinais, concluindo que a maioria dos cães com doenças gastrointestinais tem disbiose. A disbiose é caracterizada por uma diversidade significativamente diminuída, e reduzida presença de

Faecalibacterium, *Fusobacterium*, *Blautia*, *Turicibacter* e *Clostridium hiranonis*, bem como um aumento do índice de disbiose, e abundância de *E. coli*, em comparação com cães saudáveis (Alshawaqfeh *et al.*, 2017).

Embora a colonização microbiana fosse tradicionalmente atribuída ao nascimento, alguns estudos indicam que o feto a termo já pode abrigar bactérias. O desenvolvimento da microbiota começa ainda na vida fetal e é influenciado pelo tipo de parto, colostro, leite, ambiente e dieta. A microbiota materna e sua dieta também impactam a microbiota intestinal dos filhotes, sendo fatores críticos para a sobrevivência dos mesmos (Balouei *et al.*, 2023).

É crescente na medicina humana o interesse do transplante de microbiota fecal no tratamento da infecção recorrente por *Clostridioides difficile* (CDI), também citado como promissor no tratamento da doença de Crohn (Fehily *et al.*, 2021). No entanto, sua disseminação na rotina clínica é limitada por obstáculos como a falta de centros especializados e dificuldades com o recrutamento de doadores.

Para superar tais desafios, destaca-se a relevância de existirem biobancos de fezes, que garantam acesso confiável ao TMF para os pacientes, e um processo seguro e rastreável. Pesquisadores de diferentes partes do mundo discutem questões relacionadas a futuros biobancos de fezes, com especificações e critérios sobre princípios, objetivos, organização, seleção de doadores, entre outros temas, com base em evidências disponíveis, para promover acessibilidade ao TMF na prática clínica (Camarota *et al.*, 2021).

O conceito geral de um biobanco é recente e refere-se a uma coleção organizada de material biológico humano para fins de pesquisa, sob regulamentação ética e operacional, sem fins comerciais (Brasil, 2011). Ainda não há um consenso internacional sobre sua definição, mas é distinto de biorrepositórios, que são temporários e específicos para projetos de pesquisa. Assim, mais especificamente, até então não existe, no Brasil, uma definição regulamentada para biobanco de fezes, seja para humanos ou cães.

Pilarski e Myszczyk (2014) exploraram a necessidade de uma legislação, princípios e critérios que possam regulamentar o uso de biobancos humanos, que inclui-se também a necessidade de uma legislação específica para biobancos animais.

Apesar da falta de consenso sobre o conceito de biobanco, algumas premissas são essenciais para a constituição de um biobanco, tais como: possuir dados

associados ao material biológico, garantir um padrão de qualidade que contemple todas as etapas de processamento, um sistema informatizado que permita rastreabilidade das amostras e a garantia de confidencialidade e respeito aos direitos do doador da amostra (Salgueiro, 2016).

O Consórcio de TMF para animais de companhia foi criado para avançar com segurança na área veterinária, reunindo os principais pesquisadores em TMF, com o objetivo de desenvolver as primeiras diretrizes clínicas para o uso dessa técnica em animais de estimação. Tais diretrizes buscam simplificar o processo de TMF, tornando-o mais acessível aos veterinários. O desenvolvimento dessas orientações envolveu, além da seleção de especialistas, a identificação de tópicos-chave, e a criação de declarações baseadas em evidências, seguindo um processo de consenso veterinário, que não configura normativa regulatória (Jenessa *et al.*, 2024).

A tecnologia e a biotecnologia terão papel crescente na medicina veterinária, oferecendo recursos capazes de maximizar a prevenção e tratamento de doenças agudas e crônicas de forma eficaz. Inovações tecnológicas e biotecnológicas estão disponíveis e já são realidade nos consultórios veterinários, como o sequenciamento de marcadores de DNA para identificação de microrganismos, biomarcadores diagnósticos, exames menos invasivos, maior qualidade e precisão de imagens e videocirurgias (Barbugli Filho; Amaral; Trovatti, 2024).

O principal desafio na medicina interna veterinária de cães é promover a longevidade dos pacientes. É amplamente reconhecido que processos alostáticos recorrentes, resultantes de inflamações crônicas de baixo grau, estão associados à diminuição da vitalidade da microbiota intestinal, o que, por sua vez, compromete a saúde intestinal desses indivíduos. Portanto, a busca por uma saúde intestinal otimizada deve ser uma prioridade nas abordagens clínicas voltadas para cães.

A nutrição desempenhará um papel cada vez mais significativo nas práticas clínicas, assim como as terapias destinadas a revitalizar microbiotas disfuncionais. Nesse contexto, o transplante fecal tem se mostrado uma opção promissora. Essa tendência deverá impulsionar a produção em escala de enemas fecais seguros e confiáveis, e outras formas de apresentação, como cápsulas, que ainda estão por ser exploradas. Até o momento, os prebióticos, probióticos (Cepas, bactérias) e simbióticos disponíveis não têm conseguido revitalizar microbiotas disfuncionais de maneira eficaz.

Conceitualmente os probióticos são microrganismos vivos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, administrados em quantidades específicas para proporcionar benefícios à saúde do hospedeiro, modulando a microbiota intestinal. Os prebióticos por sua vez, consistem em substratos não digeríveis, como inulina e oligofrutoses, fermentados seletivamente por bactérias benéficas no cólon, promovendo seu crescimento e inibindo o desenvolvimento de táxons patogênicos. Os simbióticos representam uma combinação sinérgica de probióticos e prebióticos, potencializando efeitos mútuos na microbiota. Os pós-bióticos englobam metabólitos, paredes celulares e ou componentes inativados de probióticos, exercendo ações benéficas independentes de fornecimento microbiano, como imunomodulação. Esses conceitos sustentam intervenções nutracêuticas em saúde intestinal (Bielecka; Biedrzycka; Majkowska, 2002).

Diante desse cenário, a elaboração de um dossiê detalhado e fundamentado sobre enemas fecais provenientes de um biobanco parece ser uma proposta altamente relevante. Tal iniciativa, não apenas contribuirá para o avanço do conhecimento científico na área, mas também poderá estabelecer diretrizes práticas para a implementação clínica do transplante fecal em cães, visando à melhoria da saúde intestinal e ao manejo de condições associadas a disbiose e inflamação crônica (Barbugli Filho; Tahara, 2024).

Enema fecal é um procedimento médico que envolve a introdução de um preparo líquido no reto para limpar o intestino, utilizado para aliviar constipação, preparar pacientes para exames ou cirurgias, ou remover fezes impactadas. Propomos utilizar o termo enema para a solução fecal, por ter apresentação líquida e ser injetada por sonda retal.

A pesquisa proposta busca responder a questões fundamentais sobre a produção de enemas fecais para transplante fecal em cães, visando estabelecer um consenso e um protocolo ideal. As perguntas centrais incluem: qual é o protocolo mais eficaz para a produção de enemas fecais? Quais cuidados devem ser tomados para garantir a segurança do material utilizado?

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta pesquisa é desenvolver uma referência de biobanco de fezes caninas, considerando para tal a descrição do processo de seleção dos doadores, a partir da análise do sequenciamento da microbiota, a caracterização físico-química e biológica dos enemas, o armazenamento, a conservação das microbiotas caninas pela produção de enemas, o transporte e orientação de uso, visando a segurança e eficácia do transplante fecal canino.

A investigação abrange desde a seleção rigorosa dos doadores até os processos de manipulação, diluição, armazenamento e quantidades a serem infundidas, com base nas publicações científicas existentes. Uma vez definido um método justificado, o estudo concentra-se nos resultados obtidos em pacientes com dermatite atópica e disfunções gastrointestinais. Além disso, o trabalho propõe definições claras sobre os táxons desejados e indesejados na microbiota dos doadores, bem como o comportamento e a transformação da microbiota dos animais tratados ao longo do tempo. Objetiva-se também avaliar as transformações na microbiota por um período e as respostas clínicas dos pacientes submetidos ao tratamento.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos, elencam-se:

- Caracterização (clínica) dos doadores e sua microbiota para definição do perfil de microbiota saudável, com a identificação por sequenciamento 16S rRNA da microbiota do doador ideal;
- O procedimento de coleta das fezes do doador eleito;
- Definição do processo de armazenamento, conservação e preparo das suspensões denominadas enemas;
- Definição do procedimento de transplante da microbiota fecal;
- Elaboração do painel da microbiota dos doadores;
- Avaliação dos critérios de qualidade do enema armazenado;
- Avaliação e estudo dos requisitos de registro do biobanco.

A Figura 1 representa, de modo geral, as principais etapas da pesquisa, para a concepção de um biobanco de fezes caninas.

Figura 1: Esquema representativo do desenvolvimento do biobanco de fezes caninas



Fonte: Do autor (2024).

1.3 JUSTIFICATIVA

O enema fecal é uma adaptação de uma técnica rotineira conhecida como enema de retenção, que consiste na inserção de fluidos no reto, por meio de equipamentos apropriados, de modo que possam permanecer por períodos relativamente longos, e serem absorvidos pelo cólon. No enema fecal, os fluidos terapêuticos são substituídos por uma suspensão diluída de fezes (Barbugli Filho; Gorni; Amaral, 2024).

Mesmo com o crescente interesse na comunidade de saúde humana, e a conscientização dos pacientes, questões técnicas e logísticas dificultam sua implementação segura e regulada na prática clínica. Apesar dos avanços, ainda existem desafios a serem enfrentados, como a necessidade de protocolos padronizados e a superação de barreiras culturais relacionadas ao uso de fezes humanas em tratamentos médicos. A aprovação recente pela *Food and Drug*

Administration (FDA), a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, de medicamentos baseados em transplante fecal, como o Vowst[®], representa um passo importante na aceitação dessa terapia, oferecendo uma alternativa mais acessível e rigorosamente testada.

A Conferência de Consenso Europeia reuniu especialistas para desenvolver diretrizes sobre indicações em humanos, seleção de doadores, preparação do material fecal, manejo clínico e requisitos para centros de TMF. Foram divulgadas recomendações baseadas em evidências para orientar os médicos na implementação do TMF, e promover sua disponibilidade, incentivando também à pesquisas futuras na área. O relatório destaca a forte recomendação para a implementação de centros de TMF (biobancos), no tratamento da infecção por *C. difficile*, com diretrizes detalhadas para requisitos técnicos, regulatórios, administrativos e laboratoriais (Camarota *et al.*, 2021).

O conteúdo do consenso veterinário de 2024, resumiu-se a tentar definir padrões mínimos na seleção dos doadores, destacando situações impeditivas como a presença de parasitas, doenças crônicas e disbiose intestinal. No entanto, não explorou detalhes como a definição de bactérias desejáveis e indesejáveis, padrões físico-químicos dos enemas, como viscosidade e consistência; e maior detalhamento na manipulação e conservação dos enemas (Jenessa *et al.*, 2024).

Pesquisas recentes da medicina humana estão mostrando que a saúde e longevidade dos indivíduos dependem das novas descobertas sobre o papel da biota intestinal no organismo (Suarez *et al.*, 2017). No mesmo sentido, no entanto ainda incipiente, principalmente no Brasil, a medicina veterinária deve seguir a medicina humana na busca por terapias inovadoras, por meio do entendimento das correlações da biota intestinal com várias doenças.

Exemplo maior desta abordagem são os resultados obtidos a partir de transplantes fecais de animais sadios para enfermos. As enfermidades parecem mostrar certa similaridade no tocante a microbiota intestinal, ou seja, como se caracteriza a microbiota intestinal, quais bactérias (filos e gêneros) compõem o intestino do animal enfermo e saudável (Suchodolski *et al.*, 2005).

Por meio do transplante fecal já se obtêm resultados impactantes no tratamento de dermatites caninas e enteropatias (Sugita *et al.*, 2023). Resultados promissores, incluindo desde processos simples, como transplantes a fresco via oral, ou como métodos invasivos via colonoscopia.

Esta nova estratégia terapêutica da medicina veterinária, poderá em breve substituir as tratativas de uso de simbióticos, pois tal recurso tem apresentado limitação no que se refere à transformação e manutenção da biota intestinal (Minamoto *et al.*, 2022).

Até o presente momento, no Brasil, não existe registro de um biobanco de fezes caninas que possa atender clínicas interessadas em usar essa terapia (Pereira *et al.*, 2018). Tal fato representa uma contribuição do projeto, tanto para a academia, por produzir novos conhecimentos associados ao TMF, como para os pacientes que se beneficiarão do tratamento, de forma segura e com grande possibilidade de melhora e/ou cura da doença.

A segurança do biobanco de fezes é garantida pelo processo de seleção dos doadores, de garantias de adequado armazenamento e de conservação, que serão propostos neste projeto, destacando-se a definição dos táxons, por espécies desejadas e indesejadas nos enemas produzidos a partir da eleição dos doadores. O biobanco de enemas caninos proposto neste trabalho permitirá a realização da aplicação da biotecnologia básica de transplante de microbiota fecal em cães, especialmente para os portadores de dermatites ou enteropatias crônicas.

O procedimento de transplante fecal é pouco invasivo, uma vez que a manobra de infusão dos enemas é simples, rápida e possível de ser realizada em clínicas veterinárias convencionais. Acredita-se também que a logística de envio dos enemas armazenados no biobanco, inovador no Brasil, é viável, pois serão infundidos volumes pequenos nos pacientes, o que possibilitará atender uma demanda crescente a partir da existência do biobanco de fezes caninas.

Vale ressaltar a relevante importância da qualidade, padrão e protocolo a serem executados na produção dos enemas, a partir da proposta científica deste projeto, quando comparado com a utilização de fezes de doadores sem maiores critérios técnicos. Nesse sentido existe a possibilidade de patentear o processo de seleção, armazenamento e conservação dos enemas fecais, pois apesar de já existirem diversas citações, ainda não foram definidos os critérios para um protocolo, inclusive a definição e especificidade do bioma contido nos enemas, a partir da mistura de fezes de bons doadores (criteriosa seleção).

O que a literatura apresenta até o momento é a avaliação do *status* clínico dos doadores, sua classificação como indivíduos hígidos (saudáveis), e isentos de

disbiose (Bartges, 2012). Assim, a proposta deste projeto busca qualificar o biobanco como fornecedor seguro de enemas para uma ampla utilização.

Este trabalho também visa a ação empreendedora de seguir os passos para a consolidação de uma *startup* para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, no caso, um biobanco de fezes caninas e novas ofertas do enema, como em cápsulas, supositórios, o registro de marca e outras providências inerentes para a devida regulamentação necessária para comercialização.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MICROBIOTA

A microbiota intestinal é o conjunto dinâmico de microrganismos presentes no trato gastrointestinal dos animais, bem como o sistema de interações que esses organismos têm entre si e as células epiteliais do intestino (hospedeiras). Em humanos são mais de 100 trilhões de microrganismos presentes no trato digestório, sendo a maioria colonizada no cólon (Ley; Peterson; Gordon, 2006).

A microbiota intestinal tem se destacado como um tema de crescente interesse em pesquisas científicas envolvendo humanos, cães e gatos. Evidências acumuladas (Yue, Q. *et al.*, 2022) indicam que a homeostase fisiológica em indivíduos saudáveis está intimamente associada a um microbioma intestinal estável, diversificado e eubiótico. O antigo conceito de útero estéril foi desafiado, demonstrando que a formação do microbioma do indivíduo se inicia ainda durante a gestação, influenciada por fatores como o estado clínico da mãe (Wang *et al.*, 2019).

A saúde geral do indivíduo é resultado de uma complexa interação de fatores, entre os quais o microbioma intestinal ocupa posição de destaque. O trato gastrointestinal depende do microbioma para uma série de funções essenciais, incluindo a regulação do peristaltismo, a ativação de ácidos biliares, a produção de ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas, além de influenciar diretamente a digestão e a modulação do sistema imunológico (Toreson *et al.*, 2023).

Dessa forma, o estudo integrado do microbioma intestinal e suas interações com o hospedeiro é fundamental para avançar na compreensão dos mecanismos que sustentam a saúde, a prevenção de doenças e as terapias clínicas.

A microbiota intestinal tem múltiplos papéis na manutenção da saúde do hospedeiro, incluindo a defesa contra patógenos intestinais não desejáveis, como *Escherichia coli*, auxiliando no desenvolvimento de um epitélio e sistema imunológico saudável. Também desempenha papel funcional, fornecendo nutrientes para o hospedeiro, por meio de atividades fermentativas e metabólicas (Schmidt *et al.*, 2018).

Grande parte de vitaminas e minerais são disponibilizados por meio desta relação simbiótica entre a microbiota intestinal e o indivíduo. São essas interações complexas entre a microbiota, o sistema imunológico, e a genética do hospedeiro que influenciam o equilíbrio entre saúde e doença (Blake, A, Suchodolski, J.S, 2016)

A biologia molecular atual possui ferramentas que permitem caracterizar detalhadamente a microbiota intestinal de cães e gatos. Análises comparativas do gene 16S rRNA bacteriano fornecem dados filogenéticos, sendo possível comparar animais saudáveis e doentes (Suchodolski *et al.*, 2012; Handl *et al.*, 2020).

2.1.1 Disbiose e Simbióticos

Disbiose é o desequilíbrio na composição da microbiota, caracterizado por alterações qualitativas e/ou quantitativas nos microrganismos que compõem uma comunidade microbiana, presente no intestino. Esse estado está frequentemente associado à redução da diversidade microbiana e ao aumento de microrganismos patogênicos e indesejáveis, comprometendo funções fisiológicas essenciais, como a digestão, absorção de nutrientes, a imunomodulação e até a resistência a infecções. A disbiose pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, metabólicas e infecciosas (Reis *et al.*, 2022).

Os simbióticos são definidos como combinações de microrganismos vivos (probióticos), e substratos não digeríveis (prebióticos) que, juntos, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Essa definição reflete a sinergia entre os componentes, onde os prebióticos atuam como alimento para os probióticos, promovendo seu crescimento e atividade no trato gastrointestinal. Os simbióticos podem ser classificados em duas categorias: complementares e sinérgicos (Carciofi *et al.*, 2005)

Os simbióticos complementares contêm probióticos e prebióticos que funcionam de forma independente, enquanto os sinérgicos envolvem uma interação mais profunda entre os dois componentes, onde o substrato não apenas alimenta o probiótico, mas também potencializa seus efeitos benéficos. A utilização de simbióticos tem demonstrado efeitos positivos em diversas condições patológicas, incluindo a modulação da microbiota intestinal, a redução de citocinas pró-inflamatórias e a melhora na saúde digestiva. Além disso, a aplicação de simbióticos se estende à medicina veterinária, onde têm sido utilizados para promover a saúde intestinal em diversas espécies. Em suma, os simbióticos representam uma abordagem inovadora na promoção da saúde intestinal, integrando as funções dos prebióticos e probióticos para otimizar os benefícios. (Flesch; Poziomyck; Damin, 2014).

Existem muitos fatores que influenciam a composição e a estabilidade da microbiota, como por exemplo, a administração de antibióticos e probióticos. Foi demonstrado que uma variedade de antibióticos altera a microbiota (Honneffer; Minamoto; Suchodolski, 2014; Rossi *et al.*, 2014), embora a maioria dos filos e gêneros bacterianos retornem ao estado pré-tratamento dentro de algumas semanas, outros permanecem alterados por longos períodos, podendo inclusive desaparecer da biota intestinal permanentemente.

Conforme Giaretta *et al.* (2018) que estudaram um grupo de humanos saudáveis, revelaram que alguns grupos bacterianos não conseguiram se recuperar, no espaço de 6 meses após o tratamento com ciprofloxacina.

Cepas probióticas são detectáveis nas fezes de cães e gatos durante sua administração, e podem alterar a microbiota intestinal, mas essas alterações geralmente se reverterem após a interrupção da administração (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2011). Assim, o efeito dos probióticos na microbiota canina e felina é questionável quanto a sua viabilidade prática e econômica, justamente por não serem capazes de manter as alterações esperadas por longos períodos (Schmitz; Suchodolski, 2016).

Embora alguns estudos tenham mostrado que a dieta, os probióticos, simbióticos e os antibióticos possam impactar a microbiota intestinal, são necessários experimentos mais aprofundados para avaliar como essas modificações influenciam o transcriptoma (conjunto de RNAs), proteoma (conjunto de proteínas) e o metaboloma (total de metabólitos) microbiano, bem como as respostas imunológicas do hospedeiro.

2.1.2 O fator nutrição na composição da microbiota

A microbiota intestinal é um sistema dinâmico, e sua composição pode variar dentro de um mesmo indivíduo, ou seja, existem microbiotas distintas conforme a porção do trato digestório, estômago, intestino delgado e intestino grosso. De certa forma influenciado, entre outros fatores, por valores distintos do pH nestas porções bem como entre indivíduos (Desai *et al.*, 2009; Alshawaqfeh *et al.*, 2017).

A composição da biota também pode ser influenciada pela dieta (Lubbs *et al.*; 2009; Minamoto *et al.*, 2014), antibióticos, doenças gastrointestinais (Guard *et al.*, 2015), idade e outros fatores genéticos e ambientais, inclusive o estresse.

Toresson (2023) realizou vários estudos em cães e gatos e verificou os efeitos das composições dietéticas na microbiota animal. Uma dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos levou a um aumento na quantidade de algumas espécies de bactérias, quando comparada com uma dieta moderada em proteínas e rica em carboidratos. Diferenças funcionais relacionadas ao metabolismo e à biossíntese de aminoácidos também foram identificadas entre os grupos.

Beale e Laflamme (2001) apresentam um estudo que analisou o efeito da fibra alimentar em cães, comparando uma dieta pobre em fibras, com uma que continha 7,5% de polpa de beterraba. O baixo teor de fibra levou a um maior percentual de *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* e *Proteobacteria* (de baixa atividade simbiótica), e menor percentual de *Firmicutes* e do grupo *Chlorobi* de *Bacteroidetes* (de alta atividade simbiótica), quando comparado com a dieta contendo 7,5% de polpa de beterraba, mostrando a importância das fibras como prébióticos.

Abordagens funcionais mais recentes, incluindo metagenômica e metabolômica, indicam um relacionamento da informação filogenética à função fisiológica (Geary *et al.*, 2022). A microbiota intestinal de indivíduos cuja análise metagenômica — composta pelo conjunto de DNA/RNA de bactérias, vírus e fungos — apresenta maior abundância filogenética de *Firmicutes* em relação a *Bacteroidetes* tende a correlacionar-se com perfis metabolômicos enriquecidos em ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como butirato, propionato e acetato. Esse padrão evidencia como a estrutura taxonômica modula vias fisiológicas relevantes, favorecendo efeitos anti-inflamatórios e maior proteção tecidual (Geary *et al.*, 2022). Desse modo, abordagens integrativas entre metagenômica e metabolômica permitem esclarecer mecanismos causais de disbiose associados a doenças crônicas, incluindo a síndrome de Addison em humanos e doença intestinal inflamatória em cães.

2.2 DOENÇAS CRÔNICAS ASSOCIADAS AO INTESTINO

Estudos em cães e gatos demonstraram que as doenças gastrointestinais agudas e crônicas, incluindo a doença inflamatória intestinal (DII), estão associadas à alterações nas comunidades microbianas do intestino delgado e fecais (Honneffer; Minamoto; Suchodolski, 2014). Tais enfermidades podem levar a quadros de pancreatites crônicas e até exócrinas, onde a produção e ativação das enzimas pancreáticas como a tripsina, uma vez em déficit, comprometerão a digestão. Toda

vez que o sistema digestório é incapaz de metabolizar adequadamente os alimentos ingeridos, pode ocorrer um quadro de *Small intestinal bacterial overgrowth* – SIBO, supercrescimento bacteriano, ou seja, o desenvolvimento exacerbado de bactérias, ocasionando diarreias (Bethlehem *et al.*, 2012).

A contagem bacteriana total no cólon varia entre aproximadamente 10^9 e 10^{11} ufc/g, e os grupos cultiváveis mais abundantes são *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterobacteriaceae* (Honneffer; Minamoto; Suchodolski, 2014). Estudos de sequenciamento da biota intestinal (16S rRNA), descreveram o microbioma canino e felino como semelhantes em filos e alguns gêneros, ao microbioma de humanos e outros mamíferos. Em média, 10 filos bacterianos diferentes foram identificados no intestino felino e canino, como: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria*, constituindo a grande maioria de todos os micróbios intestinais (Honneffer; Minamoto; Suchodolski, 2014).

Membros abundantes menores são os filos *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Chloroflexi*. Os *Firmicutes* contêm várias sequências afiliadas ao *Clostridium cluster* e essas são, juntamente com *Bacteroides* ou *Prevotella*, os grupos bacterianos predominantes em amostras fecais (Honneffer; Minamoto; Suchodolski, 2014). No estômago temos o predomínio do *Helicobacter*, enquanto no duodeno temos: *Enterobacteriaceae*, *Clostridiales*, *Bacteroidales* e *Lactobacillales* (Honneffer; Minamoto; Suchodolski, 2014).

As doenças crônicas do trato gastrointestinal estão associadas à relação simbiótica entre o organismo e a microbiota intestinal, sendo esta influenciada pelo meio, pela dieta, pelo estresse e pela genética. Toda instabilidade da microbiota e sua constituição, acarretará em piora do quadro inflamatório intestinal sistêmico e crônico, levando a piora nas manifestações clínicas como dor, falta de apetite, cólicas, formação de gases, diarreia, piora no *score* das fezes e até hematoquezia (sangue nas fezes) (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2012).

As bactérias que invadem a mucosa intestinal também podem fazer parte da doença inflamatória intestinal neutrofílica em diversas raças de cães. Existe associação entre colites granulomatosas e neutrofílicas com bactérias invasivas oportunistas, e de difícil eliminação, dificultando a melhora clínica, principalmente por não responderem aos tratamentos com antibióticos (Schmitz; Suchodolski, 2016).

2.3 TRANSPLANTE FECAL

O primeiro artigo publicado referenciando o uso do transplante fecal humano comotratamento clínico para colite pseudomembranosa foi escrito pelo cirurgião Ben Eiseman em 1958 (Eiseman *et al.*, 1958), no entanto, somente em 1990, trinta e dois anos após, retornou relevância acadêmica e despertou a comunidade médica e científica (Luz; Waizboat, 2020).

O transplante fecal pode ter papel significativo na restauração da microbiota. Trata-se da transferência de fezes de um doador saudável e devidamente selecionado, por meio da manipulação de um enema fecal preparado em laboratório. Em humanos foi relatado que o transplante fecal apresentou altas taxas de sucesso no tratamento de infecções por *C. difficile* (Van Nood, *et al.*, 2013).

Estão em desenvolvimento na medicina humana, protocolos de processamento laboratorial que descrevem o manuseio inicial, criopreservação e descongelamento para aplicação clínica. Os procedimentos clínicos de TMF estão sendo realizados em ambiente gastroenterológico com a utilização de tubo nasojejunal ou colonoscopia, e acompanhamentos com 1, 8 e 26 semanas após o TMF. A rastreabilidade completa de equipamentos essenciais, amostras fecais e dados de correspondência do doador-receptor podem ser mantidos e seguros por até 30 anos. Um serviço clínico de TMF deve ser consolidado por um sistema de documentação completo, que cumpra com a Lei Europeia de Tecidos (Baunwall *et al.*, 2017).

Variados distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, transtornos do espectro do autismo e epilepsia, foram relatados como alterações associadas à microbiota gastrointestinal (*Gastrointestinal Microbiota*, GIM). Tal fato levanta a questão sobre a possibilidade do TMF equilibrar a GIM e, conseqüentemente, melhorar os sinais clínicos nesses pacientes (Kelly *et al.*, 2016).

O Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro - MGBA, refere-se a uma comunicação bidirecional entre a microbiota gastrointestinal (GIM) e o cérebro, envolvendo diversos sistemas e vias, como o sistema nervoso entérico, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, vias inflamatórias, sistema imunológico, neuroendócrino, e tratos neurais. O TMF é considerado um procedimento eficaz para recalibrar o GIM, administrando material fecal de um doador não afetado para um paciente doente (Yue *et al.*, 2022).

Estudos pré-clínicos demonstraram (Li *et al.*, 2019) que o comportamento, incluindo depressão, anedonia e comportamento semelhante à ansiedade, pode ser transferido de animais afetados para animais não afetados, e até mesmo entre espécies, por meio do TMF. Camundongos receptores que receberam material fecal de camundongos com estresse crônico, exibiram comportamento semelhante à ansiedade e à depressão, conforme os doadores (Andeputte *et al.*, 2016).

Essas descobertas sugerem uma promessa entre comorbidades comportamentais e epilepsia, mediada pelo eixo microbiota-intestino-cérebro. O TMF pode ser uma abordagem terapêutica potencial para normalizar o GIM e, conseqüentemente, melhorar os sinais clínicos em pacientes com distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos, incluindo a epilepsia (Li *et al.*, 2019).

Em animais, o TMF é uma terapia emergente, e o sucesso parece depender da criteriosa seleção do doador, a manipulação dos enemas e o estadiamento da doença do receptor. Vale mencionar que faz parte deste tratamento o manejo e protocolo nutricional dietético do paciente tratado, para que o transplante tenha melhores condições de permanecer estável, uma vez que a biota intestinal tem correlação direta com a alimentação. Em cães com atopia e doenças entéricas crônicas a disbiose é, na maioria das vezes, secundária à inflamação intestinal e aos danos estruturais do epitélio intestinal (Chaitman *et al.*, 2020).

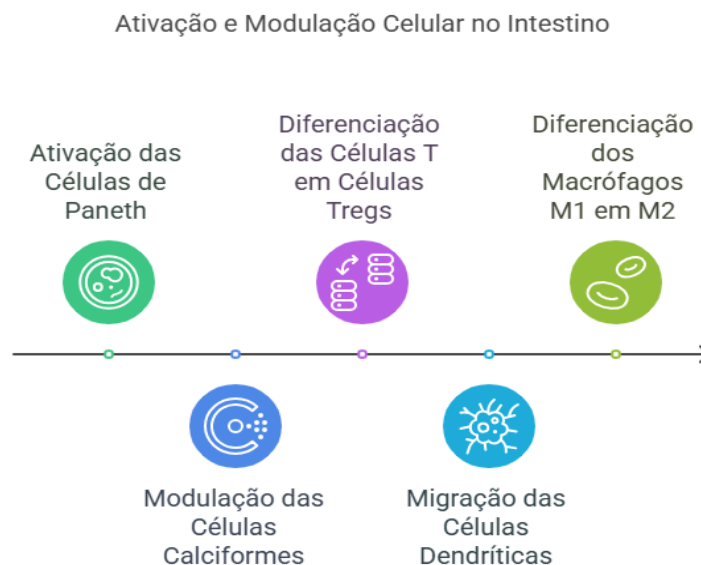
A recorrência da disbiose, e conseqüentemente dos sinais clínicos associados, ocorrerá quando a patologia subjacente ainda estiver presente. Sendo assim, o transplante fecal deve ser entendido como uma terapia adjuvante e de melhor resposta, quando comparado ao uso de simbióticos contínuos. Vale mencionar que em muitos casos a terapia de base, com uso de corticoides deverá ser mantida. Sobre tal fato são necessários mais estudos (Sung *et al.*, 2022).

Bactérias comensais, presentes em enemas de transplante fecal, previamente confirmadas em análises de fezes de doadores, juntamente com metabólitos e imunoglobulinas, são consideradas a melhor opção para infusão retal. Entretanto, a associação de enema na forma farmacêutica oral encapsulada pode obter bons resultados, uma vez que permitirá ação também no intestino delgado e íleo (Bottero *et al.*, 2017).

Nas Figuras 2 e 3 destacam-se aspectos como:

- Ativação e estimulação das células de Paneth, presentes no intestino delgado, com vida útil de 18 a 23 dias, cuja função é combater a ação de bactérias e vírus patogênicos, por meio da produção de peptídeos antimicrobianos;
- Células calciformes (Goblet cell), produtoras de muco (mucina), tem ação modulada, por meio da atuação das bactérias comensais, diminuindo citocinas inflamatórias. A ativação de ácidos biliares por bactérias como *Clostridium hiranonis*, conjuntamente com a maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (SFAs), ligam-se a receptores correspondentes nas células calciformes, modulando a secreção de mucina;
- Células T são diferenciadas em células Tregs, um subgrupo de linfócitos T, capazes de suprimirem as respostas imunes. São moduladores de alergias e antígenos, modulam inflamações;
- As células dendríticas (DCs) migram para os linfonodos mesentéricos, induzindo à produção de células Treg;
- Macrófagos M1 são diferenciados em macrófagos M2, que diminuem as respostas inflamatórias (Figura 2).

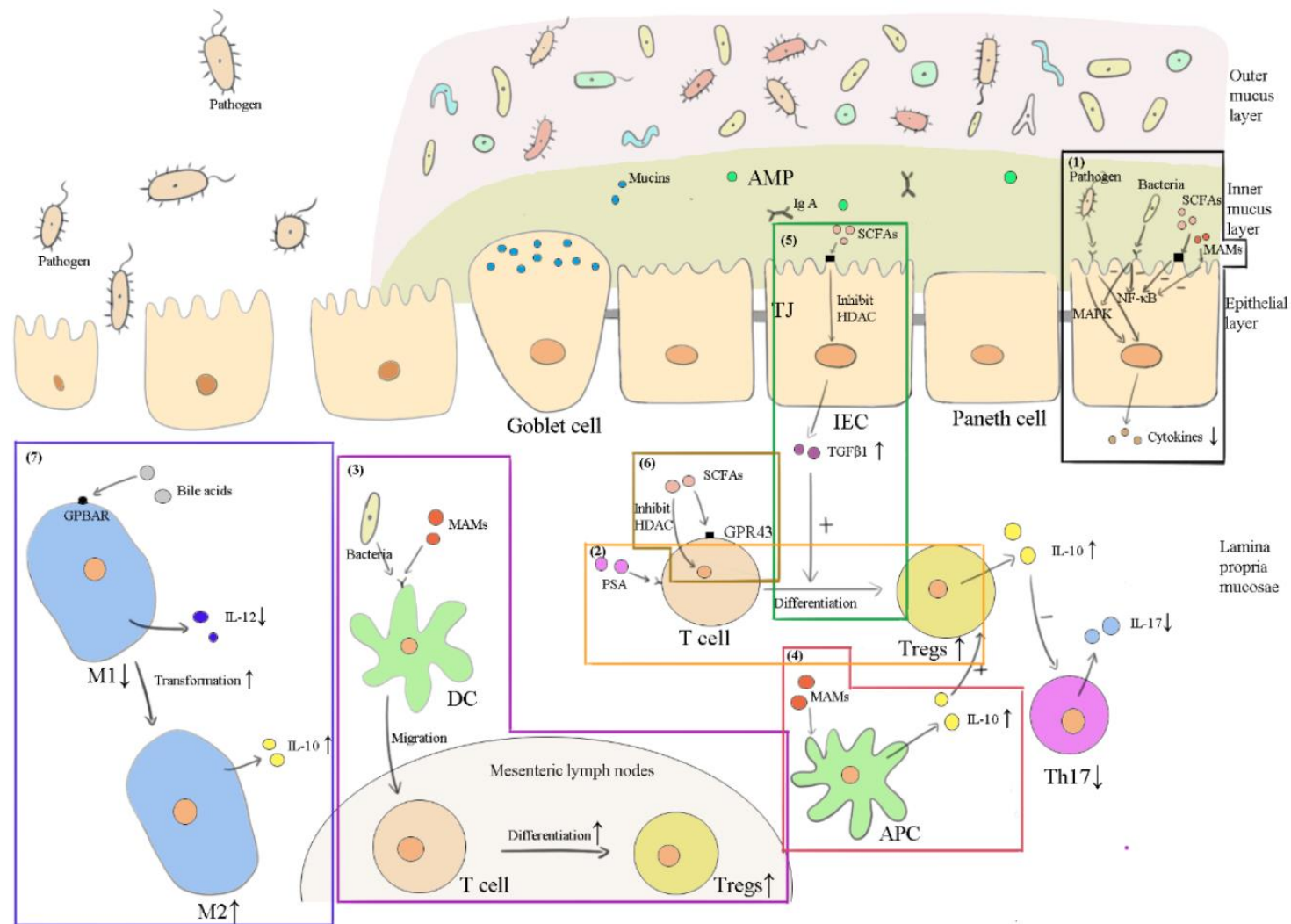
Figura 2: Resumo das principais ocorrências bioquímicas oriundas da ação de bactérias desejáveis no intestino



Fonte: Do autor (2024).

A figura 3 é uma representação de como os componentes importantes no TMF exercem ações anti-inflamatórias. O símbolo “+” representa efeitos promotivos, enquanto o “-” representa efeitos supressivos. A seção (1) indica as bactérias comensais, que inibem o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) para diminuir as citocinas inflamatórias. Ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs, provenientes das fezes do doador ou de bactérias) e moléculas anti-inflamatórias microbianas (MAMs, provenientes de bactérias) inibem o NF- κ B. Na parte (2) é representado o polissacarídeo A (PSA) de bactérias que liga-se ao receptor toll-like (TLR) 2 das células T, induzindo a produção de células T reguladoras (Treg - *Regulatory T cells*, subtipo de células T que promovem tolerância imunológica e controlam inflamação). Na parte (3) MAMs e bactérias estimulam as células dendríticas (DCs) a migrarem para os linfonodos mesentéricos, induzindo assim a produção de Treg. Na parte (4) MAMs também estimulam as células apresentadoras de antígenos (APCs- *Antigen-Presenting Cells*, Células apresentadoras de antígeno que iniciam a ativação de linfócitos T) a produzir IL-10. Na seção (5) SCFAs promovem as células epiteliais intestinais (IECs - *Intestinal Epithelial Cells*, formam a primeira barreira física e imunológica do intestino) a secretarem o fator de crescimento transformador (TGF) β 1, o que impulsiona a diferenciação de células T em Tregs. Na parte (6) SCFAs podem induzir diretamente a produção de Treg por meio do GPR43 nas células T ou inibindo a histona desacetilase (HDAC) nas células T. E na parte (7) ácidos biliares promovem a transformação de macrófagos classicamente ativados (M1) em macrófagos alternativamente ativados (M2) para limitar a inflamação.

Figura 3: Ação das bactérias no intestino pós-transplante fecal



Fonte: Li *et al.* (2022), p. 20.

2.3.1 A biotecnologia do transplante fecal para transformação da microbiota dos transplantados

O TMF é um exemplo do uso da biotecnologia como recurso capaz de propor soluções para um problema no âmbito da saúde, a partir do uso de processos biológicos (Malajovich, 2016), por meio do transplante fecal, no caso, os enemas de fezes de doadores saudáveis para pacientes com inflamações crônicas de baixo grau.

Como ocorre o processo de transformação rápido e de alto impacto da microbiota do transplantado, ainda não foi totalmente esclarecido, sendo esta, a motivação para um grande número de pesquisas, tanto na área humana quanto veterinária, nos últimos 5 anos (Toresson *et al.*, 2023).

O TMF segue abordagem que busca explorar o potencial da ecologia microbiana do próprio corpo humano. Segundo Anderson (2004), existiam abordagens ecológicas na medicina, pelo menos desde meados da década de 1930. Dessa perspectiva, outras abordagens de cunho mais ecológico, como o uso de probióticos, podem ser interpretadas como participantes de um estilo de pensamento diferente daquele dos caçadores de micróbios.

2.3.2 Análise taxonômica das bactérias

O sequenciamento do gene do RNA ribossomal (rRNA)16S bacteriano pela tecnologia Nanopore permite identificar com precisão uma ampla gama de bactérias no nível de espécies. O rRNA 16S, constituinte da subunidade menor do ribossomo bacteriano, possui regiões variáveis que permitem a identificação de bactérias via sequenciamento (Johnson *et al.*, 2019).

O sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano via tecnologia Nanopore (Oxford Nanopore Technologies) possibilita a identificação precisa em nível de espécies, superando limitações de plataformas short-read como Illumina e Oxford Nanopore sequenciamento shotgun. Diferentemente do Illumina, que gera fragmentos curtos (~300-500 pb) de hipervariáveis V3-V4, o Nanopore produz leituras longas (>1.500 pb), abrangendo todo o gene 16S rRNA (V1-V9), melhorando a resolução taxonômica em amostras polimicrobianas Sua superioridade reside na detecção de táxons raros e estimativa precisa de riqueza alfa, com custo acessível e fluxo de trabalho portátil (Souza, 2024).

2.4 BIOBANCO

2.4.1 Estabelecimento de Biobancos: Diretrizes e Considerações Éticas

Os biobancos podem ser instituídos por diversas entidades, incluindo órgãos governamentais, organizações não governamentais e empresas privadas, com propósitos clínicos e de pesquisa. Esses propósitos abrangem transplantes, transfusões de sangue, diagnósticos genéticos e investigações farmacogenéticas, além de estudos sobre doenças específicas. Um aspecto crucial na operação de biobancos é o rigoroso cumprimento das normas éticas, legais e regulatórias, especialmente no que se refere à privacidade e ao consentimento informado dos doadores de amostras. Os biobancos de fezes caninas representam um campo emergente que está ganhando relevância devido à sua importância no estudo do microbioma intestinal e suas potenciais aplicações tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana (Zica, 2010).

Para o desenvolvimento eficaz de um biobanco de fezes, as seguintes etapas são consideradas fundamentais:

1. Definição do Escopo e Objetivo: É essencial estabelecer claramente os objetivos do biobanco, incluindo os tipos de amostras a serem coletadas, a população-alvo e as áreas de pesquisa pretendidas (Universidade Federal do Paraná, 2012).
2. Estrutura Ética e Legal: Deve-se garantir a conformidade com diretrizes éticas e requisitos legais pertinentes ao biobanco, incluindo a obtenção do consentimento informado dos doadores e a proteção da privacidade e confidencialidade das informações (Cordeiro *et al.*, 2017).
3. Desenvolvimento de Procedimentos Operacionais Padrão (SOPs): A criação de SOPs detalhados para coleta, processamento, armazenamento e gerenciamento dos dados das amostras é crucial para manter a qualidade e integridade das amostras (Chevrant, 2015).
4. Implementação de Medidas de Controle de Qualidade: É necessário estabelecer procedimentos rigorosos de controle de qualidade para monitorar a integridade das amostras, as condições de armazenamento e a precisão dos dados, assegurando a confiabilidade do biobanco (Alonso *et al.*, 2007).
5. Utilização de Sistemas de Tecnologia da Informação (TI): A implementação de sistemas de TI é fundamental para gerenciar informações sobre as amostras,

rastrear sua localização e facilitar o compartilhamento de dados e a colaboração com outros biobancos ou instituições de pesquisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011).

6. Interação com as Partes Interessadas: A colaboração com pesquisadores, profissionais da saúde, doadores e órgãos reguladores é essencial para promover transparência, comunicação eficaz e apoio à iniciativa do biobanco.
7. Registro em Redes de Biobancos: A adesão a redes nacionais ou internacionais de biobancos pode aumentar a visibilidade do projeto, facilitar o compartilhamento de amostras e promover colaborações globais. Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 2005).
8. Diretrizes Éticas e Consentimento Informado: A obtenção do consentimento informado dos doadores deve ser rigorosamente seguida, respeitando as diretrizes éticas para proteger os direitos e a privacidade dos participantes (Alonso *et al.*, 2007).
9. SOPs para Coleta e Processamento: É fundamental desenvolver e implementar SOPs para garantir a qualidade na coleta, processamento e armazenamento das amostras. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2011).
10. Controle da Qualidade: Estabelecer procedimentos específicos para monitorar a qualidade das amostras, as condições de armazenamento e a precisão dos dados é imprescindível para assegurar a confiabilidade do biobanco (Martinez *et al.*, 2012).
11. Gerenciamento de Dados com Sistemas de TI: A utilização eficiente de sistemas de tecnologia da informação é crucial para o gerenciamento dos dados, rastreamento das amostras e colaboração com outras instituições (Carreiro; Maranduba, 2019).
12. Conformidade Legal: É necessário garantir que todas as operações do biobanco estejam em conformidade com os requisitos legais relacionados à coleta e armazenamento de amostras biológicas (Brasil, 2011).

Embora o registro formal do biobanco não seja obrigatório, algumas práticas devem ser seguidas (Carreiro; Maranduba, 2019).

A Figura 4 representa um resumo das práticas descritas para atender as exigências do MAPA.

1. Manter um sistema interno de controle com um histórico detalhado das amostras (origem, características e uso).

2. Estar preparado para auditorias por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2005).
3. Resumir os passos necessários.
4. Licenciamento no MAPA: Registrar a empresa e o produto final.
5. Registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen): Se envolver recursos genéticos.
6. Aprovação ética: Obter consentimento e registrar protocolos junto ao Comitê Ético em Uso Animal (CEUA).
7. Biossegurança: Cumprir normas relativas ao transporte, armazenamento e descarte seguro de resíduos biológicos.
8. Desenvolvimento e registro do produto: Submeter estudos e relatórios ao MAPA para obtenção da liberação comercial. Ministério da Saúde (Brasil, 2011).

Essas diretrizes são essenciais para garantir que os biobancos operem dentro dos padrões éticos e legais adequados, promovendo avanços significativos na pesquisa científica e na prática clínica.

A Figura 4 representa as principais ações estratégicas para a estruturação eficaz do biobanco de fezes caninas.

Figura 4: Práticas necessárias para atender as demandas do MAPA para Biobanco



Fonte: Do autor (2024).

2.5 SÍNTESE DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Quadro 1: Resumo da fundamentação teórica

(Continua)

Conceito	Definição	Referência
Microbiota	<p>A microbiota intestinal é o conjunto de microrganismos presentes no trato gastrointestinal dos animais, e envolve as interações entre esses microrganismos e as células intestinais do hospedeiro. Em humanos, estima-se que existam trilhões de microrganismos, principalmente no cólon. Atualmente, a biologia molecular permite uma caracterização detalhada da microbiota em cães e gatos, sendo possível, por meio de análises do gene 16S rRNA bacteriano, comparar a microbiota de animais saudáveis.</p>	<p>Ley; Peterson; Gordon, 2006) Suchodolski <i>et al.</i>, 2008a, Handl <i>et al.</i>, 2011.</p>
Saúde intestinal	<p>A microbiota intestinal tem múltiplos papéis na manutenção da saúde do hospedeiro, incluindo a defesa contra patógenos intestinais não desejáveis, auxiliando no desenvolvimento de um epitélio e sistema imunológico saudável, também desempenha papel funcional, fornecendo nutrientes para o hospedeiro, por meio de atividades fermentativas e metabólicas. Grande parte de vitaminas e minerais são disponibilizados através desta relação simbiótica entre a biota intestinal e o indivíduo. São estas interações complexas entre a microbiota, o sistema imunológico, e a genética do hospedeiro que influenciam o equilíbrio entre saúde e doença.</p>	<p>Schmidt <i>et al.</i>, (2018).</p>
Disbiose	<p>Existem muitos fatores que influenciam a composição e a estabilidade da microbiota, por exemplo, a administração de antibióticos e probióticos. Foi demonstrado que uma variedade de antibióticos altera a microbiota e, embora a maioria dos filos e gêneros bacterianos retornem ao estado pré-tratamento, dentro de algumas semanas, alguns permanecem alterados por longos períodos, podendo inclusive desaparecerem da biota intestinal permanentemente. Por exemplo, um estudo em humanos saudáveis revelou que alguns grupos bacterianos não conseguiram ser recuperados dentro de 6 meses, após o tratamento com ciprofloxacina.</p> <p>Cepas probióticas são detectáveis nas fezes de cães e gatos durante a administração, e podem alterar a microbiota intestinal até certo ponto, mas essas alterações geralmente revertem após a interrupção da administração. O efeito dos probióticos na microbiota canina e felina é questionável quanto a sua viabilidade prática e econômica, justamente por não serem capazes de manter as alterações esperadas por longos períodos.</p> <p>Embora alguns estudos tenham mostrado que a dieta, os probióticos, simbióticos e os antibióticos podem impactar a microbiota intestinal, são necessários experimentos mais aprofundados para avaliar como essas modificações influenciam o transcriptoma (conjunto de RNAs), e o metaboloma (total de metabólitos) microbiano, bem como as respostas imunológicas do hospedeiro.</p>	<p>Suchodolski <i>et al.</i> (2009). Igarashi <i>et al.</i> (2014). Giaretta <i>et al.</i> (2018). Garcia-Mazcorro <i>et al.</i> (2012). Schmitz; Suchodolski (2016).</p>

(Continuação)

Conceito	Definição	Referência
Nutrição	<p>A composição da biota também pode ser influenciada pela dieta, antibióticos, doenças gastrointestinais, idade e outros fatores genéticos e ambientais, incluso o estresse. Vários estudos realizados em cães e gatos analisaram os efeitos das composições dietéticas na microbiota. Uma dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos levou a um aumento na quantidade de algumas espécies de bactérias, quando comparada com uma dieta moderada em proteínas e rica em carboidratos. Diferenças funcionais relacionadas ao metabolismo e a biossíntese de aminoácidos também foram identificadas entre os grupos. Outro estudo analisou o efeito da fibra alimentar em cães, comparando uma dieta pobre em fibras com uma que continha 7,5% de polpa de beterraba. O baixo teor de fibra levou a um maior percentual de Bacteroidetes, <i>Fusobacteria</i> e Proteobactéria, e menor percentual de Firmicutes e do grupo Chlorobi de <i>Bacteroidetes</i> quando comparado com a dieta contendo 7,5% de polpa de beterraba.</p>	<p>Lubbs <i>et al.</i>, 2009 Schmidt, M. <i>et al.</i>, 2018 Deusch <i>et al.</i>, 2014 Suchodolski <i>et al.</i>, 2012a Igarashi <i>et al.</i>, 2014. Inness <i>et al.</i>, 2007. Guard <i>et al.</i>, 2015. Deusch <i>et al.</i>, 2015.</p>
Inflamações crônicas	<p>Estudos em cães e gatos demonstraram que as doenças gastrointestinais agudas e crônicas, incluindo a doença inflamatória intestinal (DII), estão associadas à alterações nas comunidades microbianas do intestino delgado e fecais. Essas enfermidades podem levar a quadros de pancreatites crônicas e até exócrinas, onde a produção e ativação das enzimas hepáticas como a tripsina, uma vez em déficit, comprometerão a digestão. Toda vez que o sistema digestório é incapaz de metabolizar adequadamente os alimentos ingeridos, pode ocorrer um quadro de SIBIO, ou seja, o desenvolvimento desacerbado de bactérias, ocasionando diarreias. A contagem bacteriana total no cólon varia entre aproximadamente 10^9 e 10^{11} ufc/g e os grupos cultiváveis mais abundantes são <i>Bacteroides</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Bifidobacterium</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>. Estudos de sequenciamento da biota intestinal (16S rRNA), descreveram o microbioma canino e felino, como semelhantes em filos e alguns gêneros, ao microbioma de humanos e outros mamíferos. Em média, 10 filos bacterianos diferentes foram identificados no intestino felino e canino, como: <i>Firmicutes</i>, <i>Bacteroidetes</i>, <i>Proteobacteria</i>, <i>Fusobacteria</i> e <i>Actinobacteria</i> constituindo a grande maioria de todos os micróbios intestinais. As doenças crônicas do trato gastro intestinal estão associadas a relação simbiótica entre o organismo e a microbiota intestinal, sendo esta influenciada pelo meio, pela dieta, o estresse, e a genética. Toda a instabilidade da microbiota e a sua constituição acarretará em piora do quadro inflamatório intestinal sistêmico e crônico, levando a piora nas manifestações clínicas como: dor, falta de apetite, cólicas, formação de gases, diarreia, piora no score das fezes e até hematoquezia (sangue nas fezes). As bactérias que invadem a mucosa intestinal também podem fazer parte da doença inflamatória intestinal neutrofílica em diversas raças de cães. Existe associação entre colites granulomatosas e neutrofílicas com bactérias invasivas, oportunistas, e de difícil eliminação, dificultando a melhora clínica.</p>	<p>Honneffer; Minamoto; Suchodolsk, 2014 Bethlehem <i>et al.</i>, 2012 Suchodolski <i>et al.</i>, 2014 Suchodolski <i>et al.</i>, 2012a Schmitz; Suchodolski, 2016</p>

(Conclusão)

Conceito	Definição	Referência
TMF	<p>Este trabalho exemplifica o uso da biotecnologia como recurso tecnológico capaz de propor soluções para um problema no âmbito da saúde, a partir do uso de processos biológicos, por meio do transplante fecal, no caso os enemas de fezes de doadores saudáveis para pacientes.</p> <p>Como ocorre o processo de transformação de alto impacto e rápida da microbiota do transplantado, ainda não foi totalmente esclarecida, sendo esta, a motivação para um grande número de pesquisas, tanto na área humana quanto veterinária, nos últimos 5 anos</p> <p>O TMF segue a abordagem que busca explorar o potencial da ecologia microbiana do próprio corpo humano. Segundo Anderson (2004), existiam abordagens ecológicas na medicina pelo menos desde meados da década de 1930. Dessa perspectiva, outras abordagens de cunho mais ecológico, como o uso de probióticos podem ser interpretados como participantes de um estilo de pensamento diferente daquele dos caçadores de micróbios.</p> <p>Em animais, o TMF é uma terapia emergente e o sucesso parece depender da criteriosa seleção do doador, a manipulação dos enemas e o estadiamento da doença do receptor. Vale mencionar que faz parte deste tratamento o manejo e protocolo nutricional dietético do paciente tratado, para que o transplante tenha melhores condições de permanecer estável, uma vez que a biota intestinal tem correlação direta com a alimentação. Em cães com atopia e doenças entéricas crônicas a disbiose é, na maioria das vezes, secundária à inflamação intestinal e aos danos estruturais do epitélio intestinal.</p>	Malajovich, 2016 Toresson <i>et al.</i> , 2023
Taxonomia	<p>A plataforma de sequenciamento de terceira geração Nanopore aplicada ao sequenciamento do gene rRNA 16S é uma abordagem de biologia molecular que permite que permite identificar com precisão uma ampla gama de bactérias no nível de espécies. O rRNA 16S bacteriano possui regiões que permitem a identificação bacteriana após sequenciamento e comparação com bancos de dados.</p>	Tremblay J. <i>et al.</i> , 2015

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

Este estudo iniciou-se com uma revisão bibliográfica sistemática (RBS), sobre o tema transplante fecal canino. Foram consultadas bases de artigos relevantes na área, como: Pubmed, *Science Direct*, *Web of Science*. Os artigos mais recentes publicados nos últimos 10 anos sobre transplantes fecais em cães foram utilizados para a elaboração de um artigo de revisão sistemática e bibliometria, fundamentando importantes citações deste trabalho (Barbugli Filho; Amaral; Trovatti, 2024).

A revisão bibliográfica sistemática é um delineamento de estudo secundário, por meio do qual faz-se a busca, a seleção, a análise e a síntese de estudos primários a partir de métodos sistemáticos, com o objetivo de responder a uma questão de pesquisa lançada sobre um determinado tema, como forma de descrever o estado da arte e as lacunas presentes (Dourado; Melo, 2022), que no presente trabalho foi consolidar as principais informações inerentes ao transplante fecal, com o objetivo de elaborar diretrizes seguras para uma produção em escala de enemas fecais caninos a partir de um biobanco de fezes.

A RBS sobre o transplante de fezes em cães, foi realizada a fim de responder as seguintes questões: quais as diretrizes para eleição dos doadores, manipulação dos enemas, diluições, armazenamento e aplicações. Foi utilizado o método Prisma para a revisão sistemática (Dourado; Melo, 2022), conforme Figura 5.

Critérios de exclusão foram aplicados, descartando estudos com outras espécies (suínos, aves, equinos e cobaias), e incluindo revisões relevantes em humanos. Foram considerados artigos em inglês e português. Os principais *clusters* identificados, como ilustra a Figura 6, foram: transplante fecal, microbiota, animais, diversidade microbiológica, tratamentos e principais enfermidades.

transplante de microbiota fecal. Esses tratamentos são muitas vezes combinados para obter melhores resultados. Modificações na dieta são geralmente o primeiro passo, reduzindo nutrientes não digeridos, e conseqüentemente, a inflamação. Dietas altamente digeríveis com modulação proteica são recomendadas em casos de enteropatia.

Em algumas situações, somente a mudança na dieta pode melhorar os sintomas, diagnosticando-se uma enteropatia responsiva aos alimentos, induzindo a uma melhora gradual da inflamação e da disbiose ao longo do tempo. O transplante fecal poderá acelerar a melhora clínica, quando associada a mudança na alimentação. Assim, uma dieta natural específica, formulada por nutrólogo poderá resultar em êxito no tratamento (Schmitz; Suchodolski, 2016).

Outro aspecto a ser destacado nesta revisão sistemática é o fato de que, de modo geral, os cães têm perdido diversidade em sua microbiota intestinal ao longo do tempo (Wang, S. *et al.*, 2019) o que está associado ao aumento de doenças intestinais crônicas e atopias dermatológicas. Esse declínio pode ser atribuído à falta de contato com ambientes naturais durante a gestação e o primeiro ano de vida dos filhotes, assim como a práticas alimentares inconsistentes. Portanto, essas condições se tornam alvos prioritários para a terapia com uso do transplante de microbiota fecal.

Em casos de doenças crônicas como atopia e doenças intestinais em cães, o transplante fecal é considerado uma terapia adjuvante mais eficaz do que o uso contínuo de simbióticos, embora a terapia de base, como o uso de corticoides, muitas vezes precise ser mantida.

A biotecnologia do transplante fecal exemplifica o uso de processos biológicos para resolver problemas de saúde, embora o processo de transformação rápida da microbiota do receptor ainda não esteja totalmente esclarecido, motivando pesquisas recentes na área humana e veterinária. O transplante fecal segue uma abordagem ecológica, explorando o potencial da ecologia microbiana do organismo e o organismo.

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.2.1 *Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa Animal*

O projeto foi submetido e aprovado (Protocolo 01010097/2024) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal, os termos de consentimento (Apêndice A e B) para participação da pesquisa foram rigorosamente assinados pelos responsáveis dos animais e arquivados para comprovação, se solicitados.

3.2.2 *Caracterização do doador*

A seleção dos doadores é uma etapa fundamental do trabalho, uma vez que é a base para a formação do biobanco. Assim, como primeira triagem para a seleção dos doadores, foi elaborado um conjunto de critérios de inclusão do animal como candidato a doador. Os critérios descritos neste item, tiveram como objetivo garantir que os cães selecionados para estudo como doadores respeitassem as normas de segurança sanitária, para a produção de enemas fecais de alta qualidade para a constituição do biobanco de fezes caninas.

Os cães candidatos a doadores devem atender aos seguintes quesitos, especificados pela própria definição de saúde:

- Estar saudável, ou seja, ter olhos brilhantes e límpidos, os ouvidos devem estar limpos e sem secreção, odor e vermelhidão, o focinho limpo sem secreção ou feridas, a boca com hálito fresco, os dentes livres de tártaro ou placa bacteriana, pelagem deve estar brilhante e limpa e o peso adequado para sua raça e idade, que deve ser entre 3 a 5 anos, sem histórico de doença gastrointestinal, manifestações alérgicas e dermatológicas, assim como histórico de não terem sido acometidos de hemoparasitas, vacinados, livres de ecto e endoparasitas.
- Não foram submetidos à exposição recente, nos últimos 90 dias, a antibióticos, e não apresentaram manifestações para doenças sistêmicas como diabetes e disfunções endócrinas como hiperadrenocorticismos, hipoadrenocorticismos e hipotireoidismo.

Somente após o enquadramento prévio nesta triagem, deve-se prosseguir com a coleta de fezes dos animais pré-selecionados, para avaliação do perfil da microbiota intestinal.

3.2.2.1 Cálculo do tamanho amostral (n) de doadores

Para estabelecer a quantidade de doadores representativo para o estudo, o cálculo do tamanho da amostra (n) considerou os seguintes parâmetros:

$\alpha = 0,05$ (Nível de significância),

$E = 0,25$ (Erro)

$p = 0,9$ (Proporção de bactérias desejáveis nas fezes do doador)

$Z_{\alpha/2} = 1,96$ (Valor Z da distribuição Normal (0,1))

Assim, temos que:

$$n = \frac{p(1-p) * Z_{\alpha}^2}{E^2} \quad \text{Equação 1}$$

$$n = \frac{0,9(1-0,9) * 1,96^2}{0,25^2} \cong 6 \quad \text{Equação 2}$$

Desta forma, o planejamento do estudo foi baseado na seleção de seis doadores, para representar o perfil de cães saudáveis para o estudo de sua microbiota, que atenderam aos critérios descritos, para especificar as características de uma microbiota segura para a produção dos enemas fecais a serem utilizados no transplante fecal.

3.2.2.2 Características físicas dos doadores

As características físicas dos doadores serão avaliadas pelo *score* corporal ideal, conforme a Figura 7. Assim, foram evitados os animais com sobrepeso, pelo não atendimento aos critérios físicos, além do fato de que em indivíduos obesos são mais comuns os processos inflamatórios crônicos (Carciofi *et al.*, 2005).

Figura 7: Demonstrativo dos cálculos de IMC e % gordura corporal

Critérios para avaliação do IMC e %GC

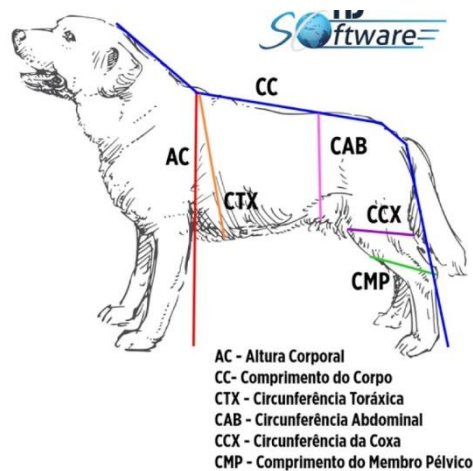
Cães	
IMC	
Abaixo do Normal	< 12
Normal	12 a 15
Acima do Normal	15 a 20
Obeso	> 20,0

Cães	
%GC	
Abaixo do Normal	< 20
Normal	20 a 30
Acima do Normal	30 a 40
Obeso	> 40

em que:

IMC = Índice de massa corporal

GC = Gordura corporal



Fonte: Do autor (2025).

3.2.3 Características físicas das fezes do doador

A Escala de Bristol categoriza a consistência das fezes em sete níveis, como descrito no Quadro 2, o que permite avaliar seu impacto, mesmo em estudos domiciliares. Essa escala é frequentemente usada clinicamente para avaliação de problemas gastrointestinais, tendo em vista que a consistência das fezes, como exemplificado na figura 8, está relacionada com a atividade microbiana e enzimática, refletindo a interação entre o tempo de trânsito intestinal e a atividade da água, ambos determinantes para a saúde intestinal (Suchodolski *et al.*, 2015).

Quadro 2: Aspectos físicos e de umidade para a escala de Bristol

Escala de Bristol	Aspecto físico	Teor de umidade
1-2	Dura	≤ 68,50
3-4-5	Normal	entre 69,00 – 77,00
6-7	Mole	≥ 78,00

Fonte: Vazque-Baeza *et al.* (2016).

Figura 8: Sistema de *score* fecal para cães



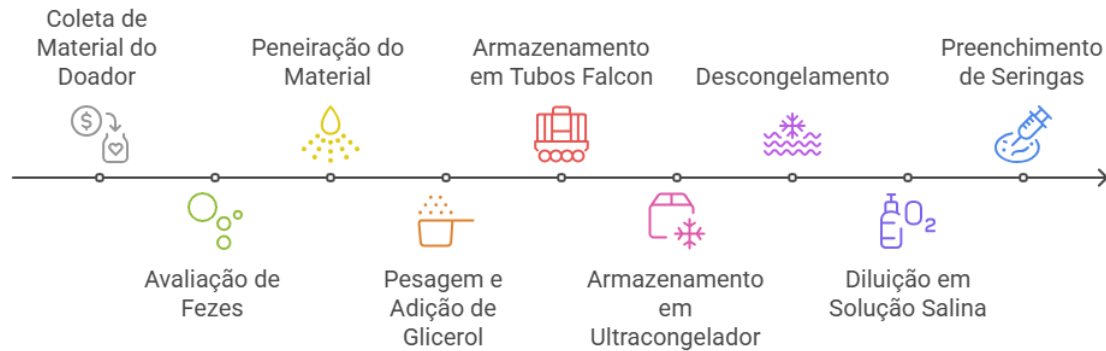
Fonte: Veterinária Royal Canin.

3.2.4 Processo de produção e armazenamento do enema fecal

Para a produção dos enemas fecais, foram considerados múltiplos doadores (n = 6) para o processo de elaboração de uma mistura de fezes (*pool*), ou seja, utilizando as fezes de mais de um doador. Esse processo visou potencializar a diversidade da microbiota, pois existem relatos de melhores resultados quando comparados com enemas fecais a partir de um único doador (Costello *et al.*, 2017).

A Figura 9 representa o processo de preparação e armazenamento dos enemas fecais.

Figura 9: Processo de preparação e armazenamento dos enemas fecais



Fonte: Do autor (2025).

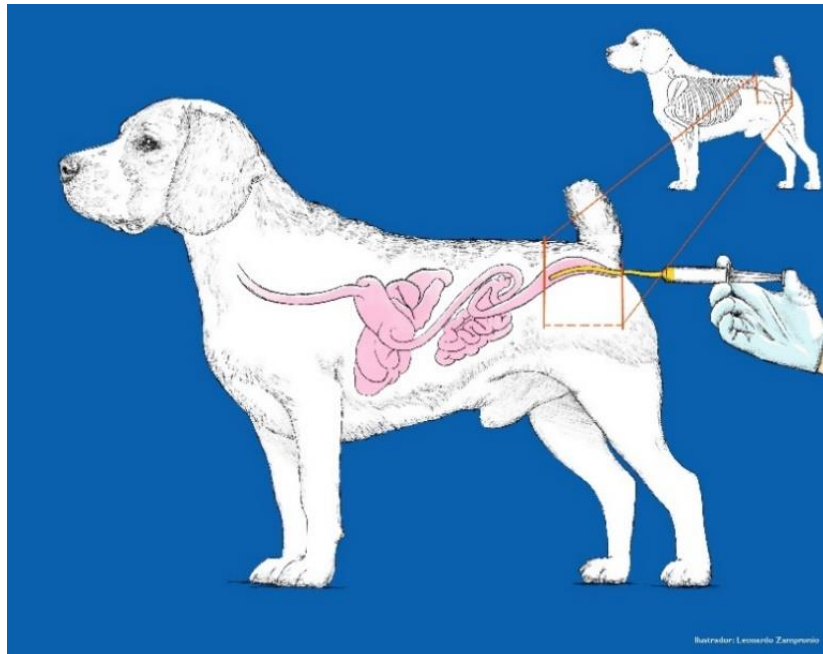
A produção do enema, compreende a preparação da mistura das fezes com agentes para conservação, até a escolha dos recipientes para o armazenamento em freezer – 80 °C e as condições que garantam a sua integridade e qualidade.

Os enemas devem ser mantidos em ultrafreezer -80 °C com segurança, e a manipulação seguirá critérios técnicos para evitar perda de qualidade. O tempo de armazenamento será analisado, para oferecer segurança para os pacientes. Todo material armazenado deve ser devidamente classificado, com dados do doador, data da coleta, data do armazenamento.

Para utilização do enema (no transplante fecal) serão definidas diluições adequadas, para atingir a consistência adequada para o transplante. Será definido um procedimento de preparo, como posologia baseada no peso dos receptores, mantendo o controle de qualidade, registro para rastreabilidade do lote e embalagem para armazenamento seguro. O acompanhamento da qualidade do enema armazenado será realizado ao longo do tempo.

Os transplantes devem ser iniciados após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Animal, e também a consolidação da etapa de seleção dos doadores, e caracterização da microbiota saudável. A Figura 10 ilustra como o transplante fecal em cães deve ser realizado.

Figura 10: Ilustração do transplante fecal em cães



Fonte: Do autor (2024), ilustrador Leonardo Zampronio

Como ilustrado na figura 10, a sonda deve ser introduzida até a região do colon descendente. A referênica anatômica (marco) para mensuração são as cristas ilíacas, visto que cranial a elas é certo não estar na ampola retal. Neste exato ponto o enema deve ser injetado, pois irá percorrer todo colon, porção do intestino grosso onde reside 85% da microbiota.

3.2.5 Cálculo do tamanho amostral (n) de receptores

Para o recrutamento dos animais voluntários (receptores), e a realização do transplante fecal, seguimos os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes, descritos na subseção seguinte, devidamente aprovado pelo comitê de ética, até atingir o tamanho da amostra. A quantidade de animais voluntários foi calculada a partir da Equação 3 e 4, em que:

$\alpha = 0,05$ (Nível de significância) $E = 0,13$ (Erro)

$p = 0,9$ (Proporção de bactérias indesejáveis nas fezes do receptor)

$Z_{\alpha/2} = 1,96$ (Valor Z da distribuição Normal (0,1))

Assim, temos que:

$$n = \frac{p(1-p) * Z_{\alpha}^2}{E^2} \quad \text{Equação 3}$$

$$n = \frac{0,9(1-0,9) * 1,96^2}{0,13^2} \cong 20 \quad \text{Equação 4}$$

Assim, foram recrutados para participar do estudo 20 cães voluntários, como receptores do transplante fecal, com quadros de dermatites ou enteropatias crônicas (dois grupos).

3.2.5.1 Critérios de inclusão de receptores

O critério de inclusão de cães para participar do estudo para transplante fecal foi baseado em laudo das injúrias de dermatites ou enteropatias e suas respectivas manifestações clínicas como, prurido de grau variado para dermatites e *score* de fezes para os animais com enteropatias.

3.2.5.2 Critérios de exclusão de receptores

Foram excluídos do grupo de candidatos ao TMF os animais que estavam fazendo uso de antibióticos, seja por via oral, injetável ou tópico. Caso algum paciente selecionado fizesse uso de algum antibiótico durante o tratamento, o mesmo seria retirado do estudo.

Durante o estudo os tutores foram orientados a informar o pesquisador/veterinário sobre todas as ocorrências com os animais, que poderiam excluí-los do trabalho, como a necessidade de uso de medicamentos, de forma a sempre garantir a segurança do animal. O documento com a descrição do monitoramento está apresentado no Apêndice D. É importante destacar, que em nenhum momento foi vetado ao tutor a desistência à continuidade do tratamento, assim como o uso de quaisquer tratamentos, caso algum animal fosse acometido de alguma injúria durante o experimento, necessitando do uso de antibióticos.

3.2.6 Controle dos riscos

Risco de rejeição

Para evitar a possibilidade de refluxo e eliminação do enema transfundido, nas primeiras 3 horas após a realização da manobra, os animais foram mantidos em observação, em ambiente clínico adequado (internação não intensiva), no Hospital VFP – Unidade Araraquara. Também foi utilizado o recurso de manter o paciente com uma fralda infantil, com o objetivo de inibir a defecação pós-transplante. No estudo com todos os transplantes realizados não houve ocorrência de refluxo.

Risco adverso do processo

Os enemas manipulados foram mantidos em ultra freezer -80°C , seguindo os devidos critérios técnicos laboratoriais de segurança, com o adequado procedimento de abrir e fechar do freezer, evitando e garantindo que o material não entrasse em risco de perda de qualidade (Suchodolski *et al.* 2012b).

Risco de reações

O único risco adverso do procedimento do TMF, conforme Suchodolski (2012a), seria a ocorrência de diarreia de leve a moderada, porém com incidência baixa, inferior a 5% dos casos. No estudo com os pacientes neste trabalho não houve ocorrência de reações adversas durante o experimento.

Demais riscos

É necessário mencionar que a eleição dos doadores, bem como dos receptores, passou pela triagem dos seus tutores, em relação ao perfil e grau de confiabilidade em cumprir as orientações necessárias para a segurança do procedimento, ou seja, a segurança do procedimento também depende da atuação dos tutores nos cuidados antes e pós transplante. Os animais transplantados permaneceram em suas próprias residências durante o período de monitoramento de 120 dias do experimento, ou seja, os animais mantiveram sua rotina, não ficaram em ambiente controlado.

Um cuidado especial foi tomado com relação a orientação a respeito da alimentação dos transplantados, que já recebiam dieta específica para suas referidas

injúrias, sendo dietas naturais, formuladas por nutrólogo ou rações hipoalergênicas e gastrointestinais. A dieta de cada paciente foi mantida, mas as guloseimas, petiscos ou qualquer outra forma de alimentação, durante o experimento deveriam ser evitadas, segundo compromisso assumido pelos tutores. Sobre este tema os tutores foram alertados, como descrito no Apêndice E, com o devido respaldo e coorientação dos médicos clínicos envolvidos no acompanhamento dos pacientes.

3.2.7 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do responsável pelo animal voluntário

O TCLE receptor elaborado está descrito no Apêndice B.

3.2.8 Planejamento do transplante fecal no animal voluntário

O responsável pelo animal deve concordar em participar do estudo, após assinar o TCLE do receptor voluntário, será orientado a agendar uma data e horário, conforme disponibilidade para a coleta das fezes do animal antes do TMF, para a realização da extração do DNA e sequenciamento do RNA ribossomal 16S. Esse exame tem o objetivo de avaliar a microbiota antes do TMF que será confrontado com o exame das fezes do animal, após o transplante.

Para iniciar o procedimento de transplante, o animal não deve estar sob medicação de antibióticos, como foi destacado como critério de exclusão do animal no estudo, pois inviabiliza o procedimento. Caso o animal esteja nesta condição, deve-se aguardar no mínimo 30 dias para novo agendamento.

Os enemas utilizados nos transplantes foram originários das amostras coletadas dos doadores, devidamente armazenadas. A proporção de enema utilizada é a concentração aproximada de 50 gramas de fezes íntegras por quilo de peso vivo do receptor, o que equivale a aproximadamente 5×10^7 UFC/g (Garcia Mazcorro, 2012).

Por ser indolor e pouco invasivo, o cão receptor não necessita de sedação para o procedimento. O tutor do receptor é orientado a submeter o animal por restrição alimentar na véspera do transplante por 12 horas, e não deve ser alimentado nas 4 horas após o transplante da microbiota fecal. Também deve passar por restrição de

atividade física de 4 a 6 horas após o transplante, para reduzir as chances de evacuação espontânea prematura (Chaitman; Gaschen, 2021).

O procedimento de transplante do enema é realizado por meio de uma seringa de ponta de cateter de 100 mL, com uma sonda retal número 22. O enema deve ser descongelado a partir do ultrafreezer, em freezer -20°C por 12 horas e, posteriormente, em geladeira por mais 12 horas. No dia do transplante permanece em temperatura ambiente por 3 horas, para que não ocorra mudança abrupta da temperatura, e no momento do transplante o enema deve ser aquecido em banho maria a uma temperatura de 30°C , a fim de atingir a viscosidade ideal, e também por estar mais próxima à temperatura do corpo do animal (38°C).

3.2.9 Acompanhamento clínico

O acompanhamento clínico dos animais transplantados, em ambos os grupos, dermato e gastro, foi realizado por observações diárias dos tutores, com anotações simples, em formulários, por 120 dias (Figura 11).

Tanto para os animais do grupo dermato quanto para o grupo de animais gastro, as informações foram codificadas criando *scores* clínicos. A metodologia e critérios foram: os dados codificados foram somados a cada 5 dias, obtendo uma pontuação, como descrito na Tabela 1.

Figura 11: Quatro fichas de acompanhamento clínico foram preenchidas mensalmente

UNIVERSIDADE DE ANAPOLIS

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS GASTROINTESTINAIS

Paciente: _____
Tutor: _____
Data do TMF: _____
Mês vigente: _____

Legenda

■ Não defecou	■ Com formato e sem muco	■ Ressecado	■ Presença de muco
■ Sem formato (mais líquido)	■ Diarreia líquida	■ Visualiza sangue	

Data	Dia	Score das fezes				Observações gerais: Apetite – Sono – Vômito – Vigor – Ingestão água
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

Avaliação clínica aprovada pelo comitê de ética animal e consentimento do tutor, especificamente ao trabalho de doutorado, como metodologia para a validação do TMF e a modelagem de um biobanco de fezes caninas. Os dados dos pacientes e seus tutores são sigilosos e serão utilizados na pesquisa sem qualquer tipo de identificação.

UNIVERSIDADE DE ANAPOLIS

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS DERMATOLÓGICAS

Paciente: _____
Tutor: _____
Data do TMF: _____
Mês vigente: _____

Legenda

■ Ausência ou prurido mínimo	■ Melhora moderada	■ Prurido igual	■ Piora do prurido
------------------------------	--------------------	-----------------	--------------------

Data	Dia	Score de prurido	Observações gerais: Apetite – Sono – Fezes – Vigor – Ingestão água
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			

Avaliação clínica aprovada pelo comitê de ética animal e consentimento do tutor, especificamente ao trabalho de doutorado, como metodologia para a validação do TMF e a modelagem de um biobanco de fezes caninas. Os dados dos pacientes e seus tutores são sigilosos e serão utilizados na pesquisa sem qualquer tipo de identificação.

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 1: Score grupo gastro

Ocorrência observada	Nota
Não defecou	0
Fezes com formato e sem muco	10
Ressecado (mais de 2 dias sem defecar)	03
Com muco e formato	02
Sem formato	(-1)
Diarreia líquida	(-3)
Diarreia com sangue	(-5)

Fonte: Do autor (2024).

* Sendo nota máxima em 5 dias: 50, e nota mínima 0.

Tabela 2: Score grupo dermato

Ocorrência observada	Nota
Prurido mínimo ou ausente	10
Melhora moderada	06
Prurido igual	03
Piora do prurido	01

Fonte: Do autor (2024).

* Sendo nota máxima em 5 dias: 50, e nota mínima 05.

3.2.10 Identificação da microbiota por sequenciamento

Optamos pela metodologia de terceira geração da plataforma de sequenciamento do gene 16S rRNA da Nanopore Oxford para identificação das bactérias, que foi terceirizado e realizado pela empresa ByMyCell, de Ribeirão Preto, que permitiu verificar com precisão, rapidez e maior abrangência, a diversidade de espécies bacterianas presentes nas amostras. O objetivo da utilização desse exame é identificar o maior número possível de espécies, classificando-as em desejáveis e indesejáveis em relação à saúde intestinal, ação inflamatória e patogenicidade.

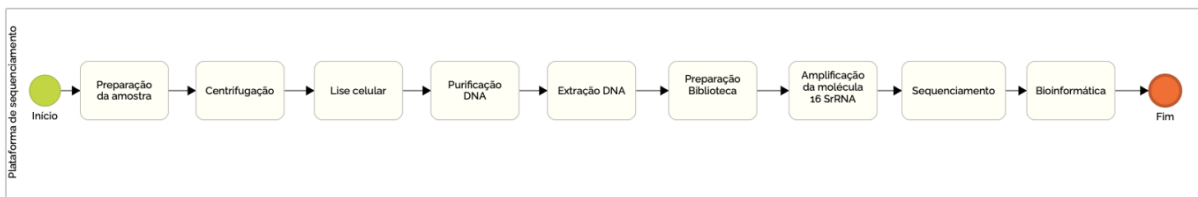
A plataforma de sequenciamento de nanoporos é uma metodologia rápida e precisa, para rastrear a distribuição de espécies microbianas que tem sido utilizada em hospitais (Tremblay *et al.*, 2015). Os resultados obtidos em nível de espécie nos permitem concluir sobre o potencial do transplante fecal na modificação do microbioma, já que as espécies são únicas. Uma avaliação somente em gêneros poderia distorcer a interpretação, uma vez que diferentes espécies podem compor o mesmo filo ou gênero, dificultando a classificação entre desejáveis e indesejáveis.

O sequenciamento Nanopore, quando comparado ao sequenciamento Illumina para analisar a microbiota intestinal, mostrou melhor precisão, classificação e replicabilidade, sendo ideal para táxons raros. Preferível quando se deseja avaliar a amplitude de espécies da microbiota intestinal (Szoboszlay, 2023).

3.2.10.1. Preparação dos DNAs e Sequenciamento do gene 16S rRNA

As amostras brutas foram extraídas com ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kit (Zymo Research). As amostras de DNA foram submetidas à amplificação do gene 16S rRNA inteiro, utilizando-se os primers 27F e 1492R (fragmento de ~ 1.6 kb). Os amplicons foram analisados em gel de agarose, quantificados para a construção das bibliotecas, utilizando o kit SQK-LSK114 (Oxford Nanopore Technologies), e sequenciados em Flongles Flow Cell (FLO-FLG114), na plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies).

Figura 12: Processo analítico taxonômico das bactérias - Plataforma de sequenciamento 16S rRNA



Fonte: Do autor (2024).

3.2.11 Análise bioinformática dos dados obtidos

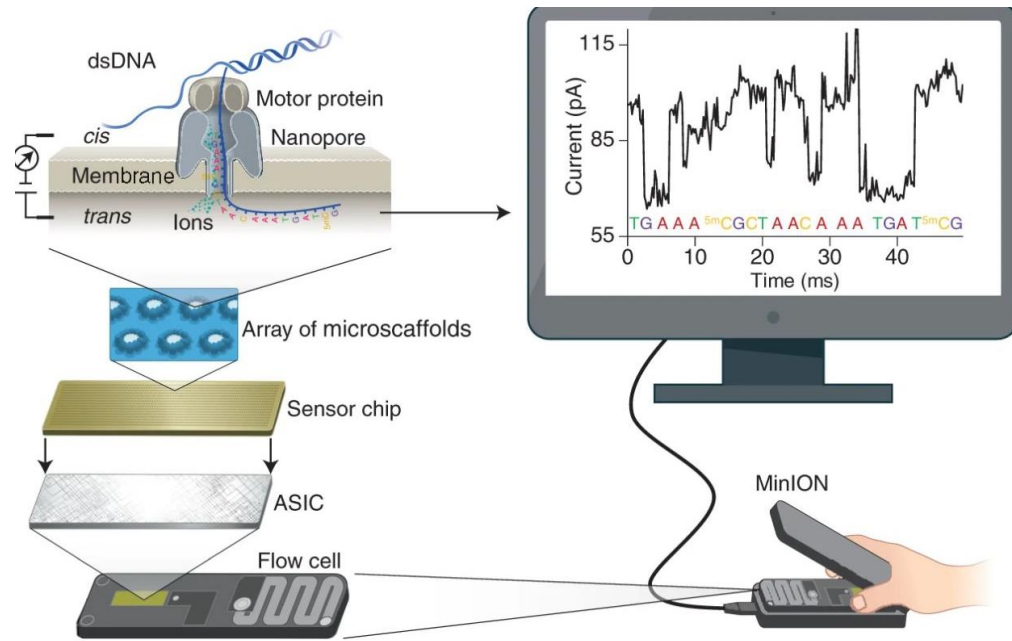
Após sequenciamento, as *reads* resultantes foram submetidas a *basecalling*, usando Guppy Basecaller (v 6.0.7), versão GPU. As *reads* produzidas, foram filtradas para o controle de qualidade em Q10, usando NanoFilt (v2.3.0), e *Demultiplex* por Porechop (v0.2.4). Os *reads* foram mapeados contra banco de dados de referência de 16S, utilizando a ferramenta KMA (v1.4.3). As análises de dados foram geradas usando Python 3.7.

Após sequenciamento, as *reads* resultantes foram filtradas para controle de qualidade e tamanho (NGSpeciesID v 0.1.3) e utilizadas para construção de fragmentos consenso por amostra (*reads* com abundância superior a 0.1%). As sequências com maior número de *reads* consenso de alta qualidade foram analisadas com a ferramenta BlastN para identificar os 10 microrganismos mais semelhantes.

O método de bioinformática, especialmente nas etapas de **Basecall** e **Demultiplex**, é essencial no processamento de dados de sequenciamento de DNA:

- Basecall**: Converte os sinais brutos do sequenciamento em sequências de nucleotídeos (A, T, C, G). A precisão é crucial, pois erros nesta etapa podem comprometer análises posteriores (Figura 13).

Figura 13: Método de Bioinformática – Basecall e Demultiplex



Fonte: Wang *et al.* (2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO DOADOR

O Termo de consentimento livre e esclarecido para os tutores dos doadores (Apêndice A) foi apresentado previamente aos tutores dos animais, para que tivessem ciência do estudo, e de todos os procedimentos e riscos a que o animal seria submetido. Voluntariamente, os responsáveis pelos animais assinaram o termo de consentimento, somente após todos os esclarecimentos e entendimento ao estudo. Participaram do estudo para candidatos a doadores 6 animais.

A participação do animal doador no estudo ocorreu em três etapas. Na primeira etapa, a participação do animal doador foi realizada com a coleta de amostra de sangue e urina para análise clínica de seu estado de saúde, para o atendimento dos critérios de inclusão. Diversos parâmetros séricos foram analisados sobre os doadores, conforme descreve-se no Quadro 3. Os exames prévios coprológicos dos candidatos a doadores foram negativados para endoparasitas e enteropatógenos. Os parâmetros de avaliação nos exames de sangue (bioquímicos e hemograma), não apresentaram alterações importantes.

Os animais pré-aprovados apresentaram resultados dentro de parâmetros aceitáveis e seguros, confirmando a anamnese clínica (para atestar a saúde) realizada pelo médico veterinário, que realizou os exames físicos nos candidatos. Os animais seguiram para sua segunda etapa de avaliação, a realização dos exames de ultrassom. Os candidatos a doadores não apresentaram nenhuma alteração no exame de imagem (ultrassom).

Quadro 3: Análises bioquímicas dos doadores

(Continua)

Análise	Valores de referência	Lorrine	Bhor	Odin
Albumina	2.6 a 3.3 g/dL	3,14	3.00	2.9
Lipase sérica	13 a 200 UI/L	143	115	135
Eritrócitos	5,5 a 8,5 milhoes / mm ³	7,66 milhoes / mm ³	6,7 milhoes/mm ³	6,5 milhoes/mm ³
Hemoglobina	12 a 18 g/100 mL	17,0 g/dL	15,0 g/dL	16,0 g/dL
Hematócrito	37 a 55 mL/ 100 mL	58,1%	49,10%	50,00%
V.C.M	60 a 77 fL	75,8 fL	73,8 fL	74,4 fL
H.C.M	19 a 23 mcg	22,2 pg	22,9 pg	23,6 pg
C.H.C.M	32 a 36%	29,3%	31,2%	31,7%
Leucócitos	6.000 a 17.000 céls/mm ³	10.300 céls./mm ³	9.400 céls./mm ³	10.400 céls./mm ³
Mielócitos	0%	0%	0%	0%
Metamielócitos	0 a 1%	0%	0%	0%
Bastonetes	0 a 2%	4%	3%	4%
Segmentados	50 a 67%	64%	52%	62%
Eosinófilos	2 a 4%	2,1%	2,0%	2,0%
Basófilos	0 a 1%	0%	0%	0%
Linfócitos	17 a 28%	22%	29%	19%
Monócitos	2 a 8%	4%	4%	4%
Plaquetas	200.000 a 500.000 mm/3	367.000 mm/3	500.000 mm/3	359.000 mm/3
Densidade urinária	1015 a 1060	1030	1028	1040
pH urinário	5 a 7	6,8	6,2	6,5
Glicosúria	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteinúria	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina urina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hematuria	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Nitrito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Leucócitos na urina	0-10	4	3	2
Hemácias na urina	0-5	1	2	2
Parasitológico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tripsina fecal	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hematozoário, Babesia - SP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hematozoario Ehrlichia - SP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ácidos biliares	0 a 12 nmL/L	5,7 nmol/L	2,7 nmol/L	1,9 nmol/L
Vit B12	251 a 908 pg/mL	342,0 pg/mL	625 pg/mL	485 pg/mL
Cortisol	10,0 a 46,0 ng/mL	17,00 ng/mL	11,00 ng/mL	14,00 ng/mL
T4 Total	12,50 a 40,00 ng/mL	29,10 ng/mL	31,20 ng/mL	18,70 ng/mL
Snap* 4Dx*Plus test	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Colesterol total	135,0 a 270,0 mg/dL	200,0 mg/dL	250,0 mg/dL	215,0 mg/dL
Creatinina	0,5 a 1,5 mg/dL	1,00 mg/dL	0,60 mg/dL	0,67 mg/dL
Fosfatase Alcalina	20,0 a 156,0 u/l	79,00 u/l	71,00 u/l	120,00 u/l
Gama Glutamil Transferase	1,5 a 6,4 u/l	4,0 u/l	6,0 u/l	6,5 u/l
Proteína Total	5,4 a 7,1 g/dL	5,8 g/dL	5,6 g/dL	5,4 g/dL
Albumina	2,6 a 3,3 g/dL	2,87 g/dL	3,00 g/dL	2,9 g/dL
Globulina	2,7 a 4,4 g/dL	3,30 g/dL	2,80 g/dL	3,00 g/dL
Relação Albumina / Globulina	Maior ou igual a 01	1,10	0,90	0,95
TGO(AST)	21,0 a 45,0 u/l	40,0 u/l	33,0 u/l	25,0 u/l
ALT	21,0 a 73,0 u/l	28,0 u/l	25,0 u/l	25,0 u/l

(Continua)

Análise	Valores de referência	Lorraine	Bhor	Odin
Triglicérides	20,0 A 112,00 mg/dl	85,0 mg/dl	95,0 mg/dl	94,0 mg/dl
Ureia	21,0 A 59,92 mg/dL	34,0 mg/dL	26,0 mg/dL	30,0 mg/dL
Tripsina imunorreativa canina	3,5 a 5,7 ug/L	4,2 ug/L	4,0 ug/L	5,0 ug/L
Amilase	185,0 a 700,0	252,0 u/L	320,00 u/L	330,0 u/L
Glicose	60 a 110 mg/dL	87,0 mg/dL	97,0 mg/dL	96,0 mg/dL
Lipase pancreática específica CPL	≤ 200	97.0 mcg/L	105.0 mcg/L	83.0 mcg/L
Albumina	2.6 a 3.3 g/dL	3,04	3.10	2.97
Lipase sérica	13 a 200 UI/L	155	110	140
Eritrócitos	5,5 a 8,5 milhoes / mm ³	7,80 milhoes / mm ³	6,7 milhoes/mm ³	6,5 milhoes/mm ³
Hemoglobina	12 a 18 g/100 mL	19,0 g/dL	16,0 g/dL	16,0 g/dL
Hematócrito	37 a 55 mL/ 100 mL	59,1%	50,10%	52,00%
V.C.M	60 a 77 fL	74,8 fL	75,8 fL	70,4 fL
H.C.M	19 a 23 mcg	23,2 pg	26,9 pg	21,6 pg
C.H.C.M	32 a 36%	30,3%	33,2%	31,7%
Leucócitos	6.000 a 17.000 céls/mm ³	9.300 céls./mm ³	7400 céls./mm ³	12.400 céls./mm ³
Mielocitos	0%	0%	0%	0%
Metamielócitos	0 a 1%	0%	0%	0%
Bastonetes	0 a 2%	3%	3%	4%
Segmentados	50 a 67%	60%	50%	62%
Eosinófilos	2 a 4%	2,1%	2,0%	2,0%
Basófilos	0 a 1 %	0%	0%	0%
Linfócitos	17 a 28%	22%	29%	19%
Monócitos	2 a 8%	4%	4%	4%
Plaquetas	200.000 a 500.000 mm/3	290.000 mm/3	357.000 mm/3	459.000 mm/3
Densidade urinária	1015 a 1060	1030	1033	1038
Ph urinário	5 a 7	6,8	6,2	6,5
Glicosúria	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteinúria	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina urina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hematuria	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Nitrito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Leucócitos na urina	0-10	1	2	2
Hemácias na urina	0-5	0	1	2
Parasitológico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tripsina fecal	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hematozoário, Babesia - SP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hematozoário Ehrlichia - SP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ácidos biliares	0 a 12 nmL/L	8,7 nmol/L	7,7 nmol/L	5,0 nmol/L
Vit B12	251 a 908 pg/mL	390,0 pg/mL	700 pg/mL	400 pg/mL
Cortisol	10,0 a 46,0 ng/mL	12,00 ng/mL	11,00 ng/mL	16,00 ng/mL
T4 Total	12,50 a 40,00 ng/mL	22,10 ng/mL	36,20 ng/mL	18,90 ng/mL
Snap* 4Dx*Plus test	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Colesterol total	135,0 a 270,0 mg/dL	210,0 mg/dL	260,0 mg/dL	205,0 mg/dL
Creatinina	0,5 a 1,5 mg/dL	1,00 mg/dL	0,70 mg/dL	0,90 mg/dL

(Conclusão)

Análise	Valores de referência	Lorraine	Bhor	Odin
Fosfatase Alcalina	20,0 a 156,0 u/l	99,00 u/l	77,00 u/l	126,00 u/l
Gama Glutamil Transferase	1,5 a 6,4 u/l	4,0 u/l	6,0 u/l	6,0 u/l
Proteína total	5,4 a 7,1 g/dL	6,0 g/dL	5,0 g/dL	5,0 g/dL
Albumina	2,6 a 3,3 g/dL	2,90 g/dL	3,10 g/dL	2,96 g/dL
Globulina	2,7 a 4,4 g/dL	3,00 g/dL	2,80 g/dL	3,10 g/dL
Relação Albumina / Globulina	Maior ou igual a 01	1,10	0,90	0,95
TGO(AST)	21,0 a 45,0 u/l	40,0 u/l	43,0 u/l	45,0 u/l
ALT	21,0 a 73,0 u/l	30,0 u/l	55,0 u/l	29,0 u/l
Triglicérides	20,0 A 112,00 mg/dl	88,0 mg/dl	99,0 mg/dl	104,0 mg/dl
Ureia	21,0 A 59,92 mg/dL	30,0 mg/dL	20,0 mg/dL	36,0 mg/dL
Tripsina imunoreativa canina	3,5 a 5,7 ug/L	4,0 ug/L	4,0 ug/L	5,0 ug/L
Amilase	185,0 a 700,0	250,0 u/L	270,00 u/L	300,0 u/L
Glicose	60 a 110 mg/dL	90,0 mg/dL	99,0 mg/dL	96,0 mg/dL
Lipase pancreática específica CPL	≤ 200	100,0 mcg/L	115,0 mcg/L	93,0 mcg/L

Fonte: Do autor (2024).

Quadro 4: Resultados dos exames de ultrassom realizados nos doadores

Órgão	Observações
Fígado	Formato anatômico e dimensões preservadas, contorno regular, parênquima homogêneo e normoecoico. Vasos e ductos preservados.
Baço	Formato anatômico e dimensões preservadas, contorno regular, parênquima homogêneo e normoecoico. Vasos lienais preservados.
Estômago	Com as linhas de parede preservadas.
Alças intestinais	Com parede normoespessa e estratificação preservada. Peristaltismo presente.
Rim (esq./dir.)	Formato anatômico e dimensões preservadas, contorno regular, normoecoico, relação córtico-medular preservada.
Bexiga	Contorno regular e parede normoespessa.
Pâncreas	Sem alterações sonográficas. Grandes vasos preservados.
Adrenais (esq./dir)	Sem alterações dignas de nota. Morfologia dentro do esperado.
Vesícula biliar	Formato anatômico preservado, contorno regular, parede normoespessa.

Fonte: M. V. Luiz Francisco Nogueira.

A segunda avaliação dos animais candidados a doadores foi a realização do ultrassom abdominal, com laudo confirmando *status* homeostático dos mesmos. Para o exame de ultrassom, o tutor recebeu uma guia de exame, prescrito pelo médico veterinário responsável pela pesquisa. Os exames de ultrassom foram agendados pelos tutores, que levaram seus respectivos animais até a clínica veterinária especializada para a realização do exame, sem custos. Os laudos dos exames foram encaminhados ao pesquisador/veterinário responsável pela pesquisa, que compartilhou os resultados com os tutores. Os exames de imagem não apresentaram

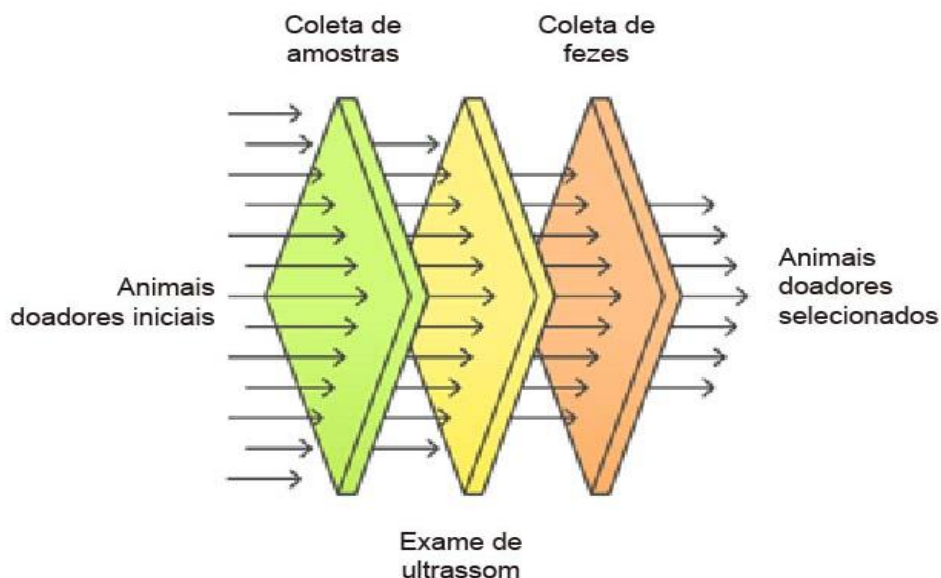
alterações relevantes, principalmente com relação ao espessamento das mucosas intestinais, anatomia renal, pâncreas, fígado e vesícula biliar.

A terceira participação dos animais doadores ocorreu apenas após a aprovação do doador nas etapas anteriores, ou seja, mediante os resultados dos exames realizados (sangue, urina e ultrassom). Assim, somente os doadores que estavam dentro das especificações de normalidade, seguiram para a terceira etapa de sequenciamento, para tal, foi realizado agendamento com os tutores, com data e local para coleta das fezes do candidato a doador.

As fezes foram coletadas por meio de defecação espontânea, em local de piso liso, limpo e previamente higienizado, sem qualquer tipo de substância que poderia alterar a integridade das fezes. A coleta e a manipulação do material fecal foi realizada com luva plástica sem bacteriostáticos.

O doador identificado foi cadastrado com todos os dados coletados, no momento zero, ou seja, logo após a conclusão dos exames da biota intestinal, perfil bacteriológico, exames clínicos e complementares do doador. No cadastro do doador foi nomeado o nome do mesmo, e também foi atribuído um código para identificação das fezes coletadas. A Figura 14 representa o processo de seleção dos doadores.

Figura 14: Processo de seleção dos cães doadores



Fonte: Do autor (2024).

4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS DOADORES

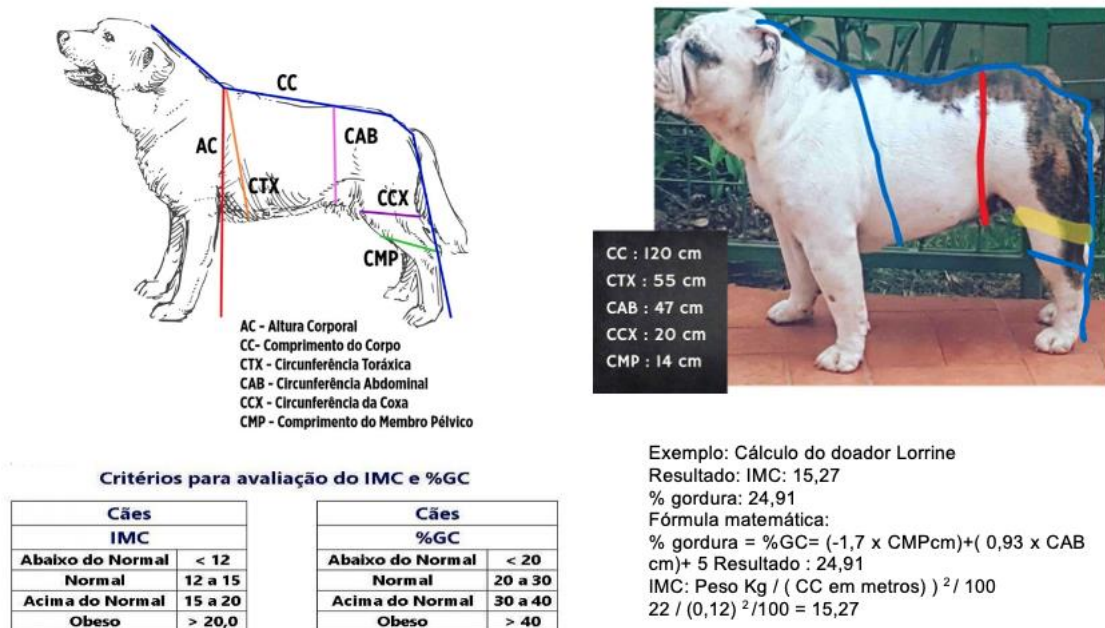
Os métodos de determinação das condições corporais mais comumente utilizados na rotina clínica veterinária, devido à sua acessibilidade econômica, incluem a pesagem, a determinação do Escore de Condição Corporal (ECC) e o Índice de Massa Corporal Canino (IMCC). Todos esses métodos podem ser realizados pelo médico veterinário na consulta clínica. A determinação do ECC requer treinamento adequado para minimizar erros durante a avaliação, garantindo assim a precisão dos resultados (Laflamme, 1997).

O IMC e a % de gordura dos doadores foram calculados, descritos no quadro 5, comprovando a adequação dos candidatos como doadores. A figura 15 ilustra como foram calculadas as medidas corporais, que especificam os critérios para a seleção dos doadores. Para esses cálculos foram aplicando as formulas já descritas na metodologia (Müller; Schossler; Pinheiro, 2008, Leal *et al.* 2011):

$$\% \text{ gordura} = \% \text{GC} = (-1,7 \times \text{CMPcm}) + (0,93 \times \text{CAB cm}) + 5$$

$$\text{IMC: } (\text{Peso Kg} / (\text{CC em metros})^2) / 100$$

Figura 15: Demonstrativo dos cálculos de IMC e % gordura corporal



Fonte: Do autor (2024).

Quadro 5: Doadores aprovados, IMC e % de gordura

Nome	Raça	Sexo	Idade em meses	Peso (kg)	IMC	% Gordura	Score corporal
Lorraine	Bulldogue inglês	Fêmea	48	25	15,27	24,91	5
Odin	Bulldogue inglês	Macho	48	30	15,90	28,40	5
Bhor	Bulldogue inglês	Macho	45	22	13,90	22,40	4
Thor	Bulldogue inglês	Macho	48	28	14,20	28,00	5
Fred	Bulldogue inglês	Macho	40	26	14,87	23,98	5
Chico	Bulldogue inglês	Macho	40	27	15,10	27,40	5

Fonte: Do autor (2024).

É importante destacar que a eleição de doadores da raça Bulldog Inglês foi inerente ao fato de os mesmos estarem sobre permanente vigilância e controle de manejo, uma vez que pertenciam a um canil de acesso diário do pesquisador. Os animais também tinham importante parentesco genético (irmãos e filhos), e todos tinham absoluto controle desde o nascimento, gestação das mães, inseminação, etc. Por outro lado, esta foi uma limitação, pois raças variadas seriam desejadas, não existindo quaisquer implicações e/ou preferências sobre raça e sexo, desde que o candidato se enquadrasse as prerrogativas definidas para ser um doador, com destaque para o perfil da microbiota intestinal e a distribuição entre táxons desejáveis e indesejáveis.

Figura 16: Doadores Lorraine(A) e Bhor(B)



(A)



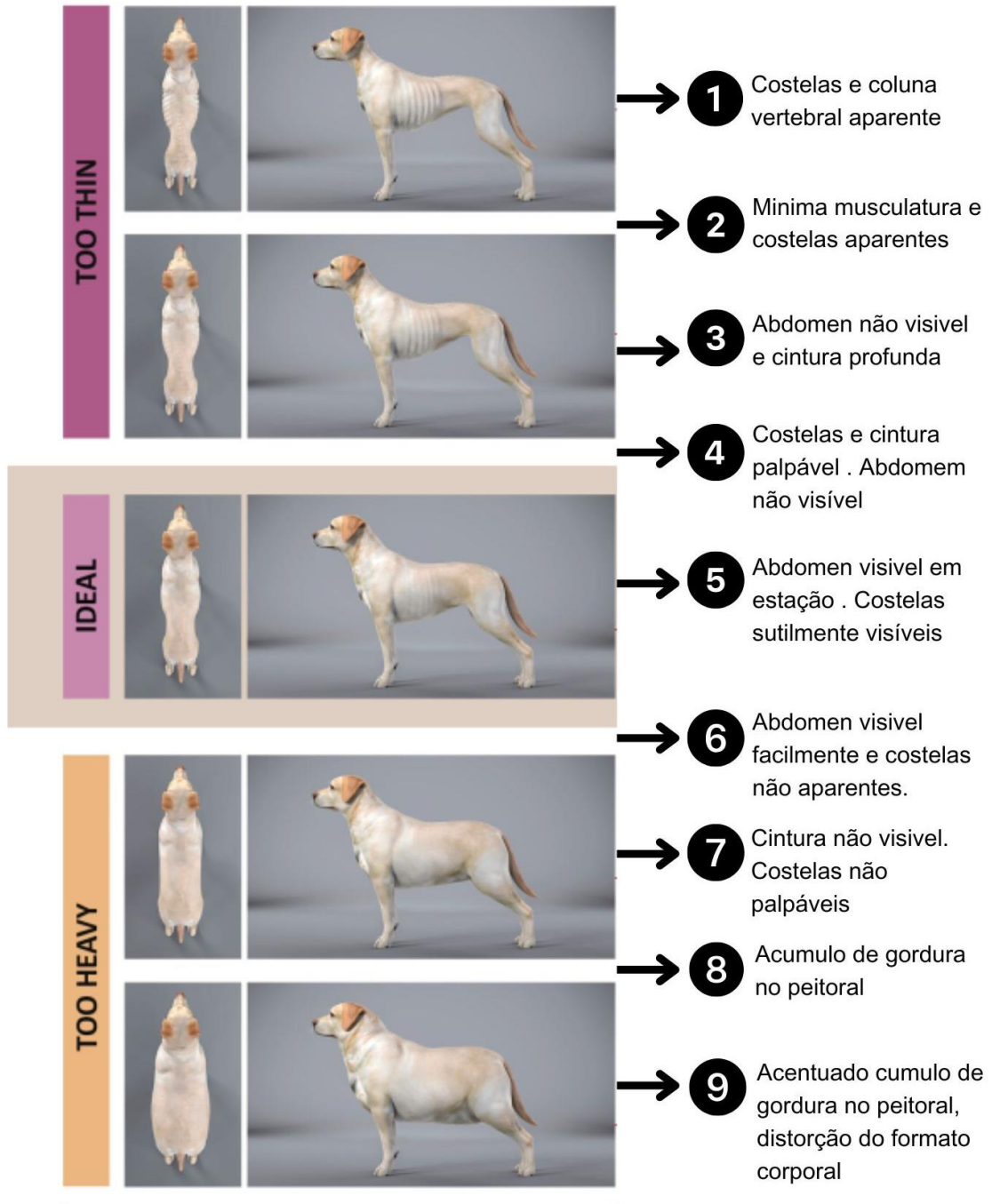
(B)

Fonte: Canil Vinner Bull's. Fotos do autor.

Figura 17: Score corporal canino

Score corporal canino

PURINA Institute
Advancing Science for Pet Health

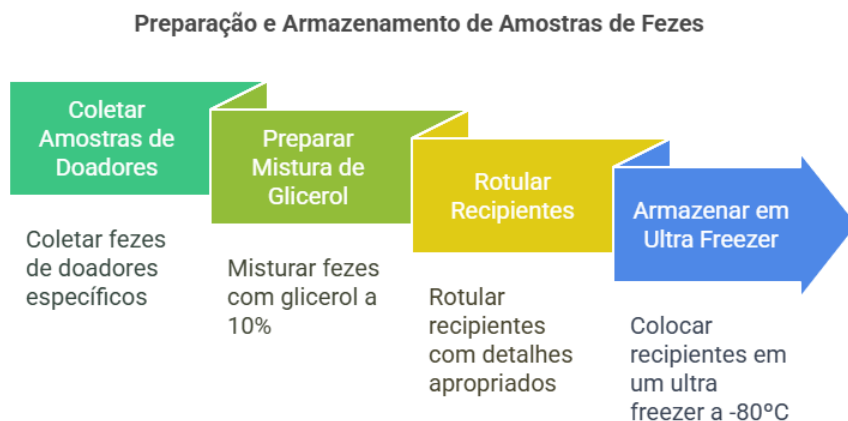


Fonte: Adaptado de Purina Institute (2024).

4.3 CARACTERÍSTICAS DAS FEZES DO DOADOR

A etapa de preparação das fezes foi realizada da seguinte forma: misturada às fezes numa proporção ajustada de glicerol de 10% antes de congelar, para a melhor preservação das bactérias. O protocolo definido consistiu em acondicionar 55 gramas de fezes íntegras, acrescidas de 5,5 mL de glicerol, que foi armazenado em um recipiente de 50 mL (falcons) adequado para o ultra freezer -80°C , rotulado com o código do doador, data e lote. As amostras foram mantidas congeladas no Ultra freezer -80°C do laboratório da Uniara. A Figura 18 representa a preparação e armazenamento do material fecal.

Figura 18: Preparação e armazenamento das amostras fecais antes da finalização dos enemas.



Fonte: Do autor (2024).

A avaliação das amostras de fezes dos doadores em relação à escala BSS está apresentada no Quadro 6, comprovando a adequação dos doadores em relação às características das fezes. Foram coletadas 10 amostras de fezes de cada doador. As mensurações da umidade das fezes foram realizadas por métodos de secagem em estufa, a 50°C , por 72 horas. O material fresco, coletado logo após a defecação, foi pesado e padronizado em 20 gramas, em balança de precisão, utilizando sempre o mesmo equipamento. Logo em seguida foi colocado em estufa por 72 horas. O material pós secagem foi pesado, e a diferença obtida entre as duas pesagens resultou na umidade obtida.

Quadro 6: Resultados encontrados nos doadores

Doador	Escala de Bristol	Aspecto físico	Escala Royal Canin	Score Royal	Teor de umidade médio
Lorraine	4-5	Normal	2,5	Ideal	72,10%
Odin	4-5	Normal	2,5	Ideal	72,50%
Bhor	4-5	Normal	2,5	Ideal	70,80%
Thor	4-5	Normal	2,5	Ideal	71,60%
Fred	4-5	Normal	2,5	Ideal	70,60%
Chico	4-5	Normal	2,5	Ideal	72,40%

Fonte: Do autor (2024).

Quadro 7: Valores de umidade de fezes frescas coletadas em 10 amostras

Doador	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	μ
Lorraine	70%	74%	79%	64%	79%	73%	70%	70%	69%	73%	72,10%
Odin	71%	73%	78%	70%	75%	72%	70%	69%	72%	75%	72,50%
Bhor	70%	74%	72%	60%	70%	72%	72%	74%	70%	74%	70,80%
Thor	70%	74%	72%	70%	73%	73%	72%	73%	69%	70%	71,60%
Fred	71%	71%	70%	72%	70%	72%	72%	71%	70%	67%	70,60%
Chico	70%	75%	78%	69%	80%	70%	71%	72%	68%	71%	72,40%

Fonte: Do autor (2024).

Na Figura 19 ilustra-se uma amostra pós defecação do doador Lorraine, a qual apresentou umidade de 71%, e foi devidamente caracterizada como padrão saudável, segundo a metodologia descrita, score fecal de cães saudáveis.

Figura 19: Fezes do doador caracterizado como tipo 5



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2024).

4.4 AVALIAÇÃO E RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DO ENEMA FECAL

Os resultados da mensuração do composto utilizado para mimetizar o enema fecal de retenção, estão apresentados na Figura 20. A unidade de medida empregada foi o Pascal por segundo (Pa.s), onde o Pascal (Pa) corresponde a uma unidade de pressão equivalente a 1 N/m^2 (Newton por metro quadrado) (Bird; Stewart; Lightfoot, 2007). O segundo(s) incorpora o fator tempo, relacionado à taxa de deformação do fluido. Dessa forma, 1 Pa.s representa a consistência de um fluido que, ao ser envolvido a uma tensão de cisalhamento de 1 Pascal, apresenta uma taxa de deformação igual a 1 s^{-1} (Barnes; Hutton; Walters, 1989).

Na prática, a concreta dinâmica, expressa em Pa.s, reflete a resistência do material ou composto ao fluxo, ou seja, sua “espessura” ou fluidez. Exemplificando, a água apresenta uma viscosidade dinâmica igual a 0,001 Pa.s, a 20°C , performando baixa resistência ao escoamento (Rouse, 1978). Em contraste, o mel mostra valores de viscosidade na faixa de 2 a 10 Pa.s, dependendo da temperatura, indicando um escoamento mais lento, devido à sua maior viscosidade (Herszberg; Penfield, 2020).

Utilizando estas referências, nossos ensaios indicaram valores de viscosidade entre 4 e 5 Pa.s, a 20 e 30 rotações por minuto (RPM), e uma temperatura de 30°C . Estes resultados corroboram os elevados benefícios do composto desenvolvido, que, apesar dessa característica demonstrada, é capaz de passar sem maior resistência pela seringa e a sonda, proporcionando uma excelente capacidade de retenção do enema. Tal comportamento físico-químico é fundamental para potencializar a eficácia do enema fecal, uma vez que permanece retido por maior período no cólon.

Figura 20: Resultado de mensuração dos enemas

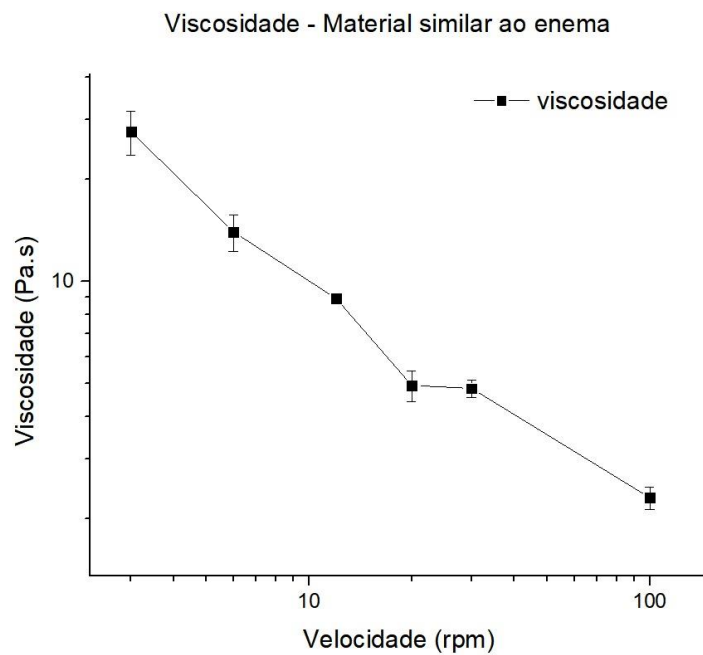


Fonte: Do autor (2025).

4.4.1 Resultados obtidos de viscosidade do enema

A Figura 21 apresenta os valores de viscosidade do enema fecal obtidos a partir da média e desvio padrão de três amostras do composto mimetizado do enema fecal de retenção.

Figura 21: Gráfico de viscosidade



Fonte: Do autor (2025).

Tabela 3: Medidas de viscosidade obtidas com desvio padrão de três amostras com temperatura de 30°C.

rpm	Pa.s	Desvio padrão
3	27,66667	4,04145
6	14	1,73205
12	8,9	00,17321
20	4,93333	0,51316
30	4,83333	0,28868
100	2,3	0,17321

Fonte: Do autor (2025).

4.4.2 Enema fecal mimetizado

Devido às objeções inerentes a contaminação e ao alto custo para aquisição de um Spindle específico, optamos por mimetizar o enema fecal para a realização da análise físico química de viscosidade.

Para o preparo do composto utilizamos ração de cães – a mesma ofertada aos doadores –, gelatina, glicerol com água, na seguinte proporção:

Fórmula do enema mimetizado:

- a. 100g ração
- b. 250 mL água
- c. 40 mL glicerol
- d. 25g gelatina

4.4.2.1 Preparo do enema mimetizado

Para a produção do enema mimetizado, necessário para a realização da medição de viscosidade, devido às limitações de uso com o enema natural, a ração canina foi imersa por 24 horas em 180 mL de água, conservada em geladeira. Após este tempo foi realizada a adição de gelatina e o glycerol, o material foi misturado em liquidificador por 6 minutos. Para obter a textura e consistência similar aos enemas naturais, completou-se a mistura com 70 mL de água.

Figura 22: Imagem comparativa entre o enema e o composto mimetizado após 5 minutos no agitador



a 10 RPM

Fonte: Do autor (2025).

A figura 22 ilustra a amostra 1, que refere-se ao enema e a amostra 2 refere-se ao composto mimetizado. Observa-se que, após a agitação, o comportamento é bastante similar entre os mesmos, caracterizando boa similaridade quanto à textura, umidade e consistência.

4.5 RESULTADOS DO ARMAZENAMENTO DOS ENEMAS EM ULTRAFREEZER

O protocolo de conservação dos enemas de retenção, conforme descrito na metodologia, subseção 3.2.4, consiste em congelar as amostras em ultrafreezer, a -80 °C, mantendo-se sem descongelamento até o momento do uso. O primeiro lote de amostras de enemas foi armazenado em 10/03/2024. Uma reanálise dos táxons bacterianos, como mostra o quadro 8, foi realizada em 14/07/2025 e 08/08/2025 utilizando a mesma metodologia de PCR quantitativo, com mensuração expressa em logaritmos pelo laboratório Stonewell. Tal procedimento comprova e assegura que a preservação e a integridade microbiana foram mantidos durante o período observado,

definindo a estabilidade do perfil taxonômico, corroborando evidências previamente relatadas na literature, que indicam o congelamento a -80°C como método eficaz para conservação de amostras microbiológicas fecais (Wang *et al.*, 2019; Sung *et al.*, 2022). Essa comprovação de conservação da microbiota é fundamental para garantir a confiabilidade dos transplantes fecais oriundos de biobancos, eliminando a possibilidade de alterações na composição bacteriana, que comprometeriam a eficácia terapêutica e sua segurança.

Quadro 8: Avaliação do congelamento

Doador	Táxons	10/03/2024	14/07/2025	08/08/2025
Doadora Lorraine	<i>Faecalibacterium</i>	5,9	5,9	5,9
	<i>Turicibacter</i>	6,6	6,0	6,0
	<i>Blautia</i>	10,3	10,1	10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,3	8,3	8,3
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,5	6,4	6,3
	<i>Streptococcus</i>	5,0	4,9	4,9
	<i>E. coli</i>	4,3	4,0	3,9
	Total bactérias	10,7	10,6	10,5

Fonte: Do autor (2025).

Os dados do quadro 8, avaliados de um doador, são os resultados de amostras em três datas: antes do armazenamento, período de congelamento de 492 dias (16,175 meses) e 518 dias (17 meses). Estes dados indicam que o período de validade de uma amostra mantida em um biobanco pode ser de no mínimo de 12 meses.

4.6 SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL FECAL DO DOADOR

O Quadro 9 apresenta os dados analíticos do material fecal dos doadores, segundo painel de disbiose do A & M Texas e Laboratório Stonewell. Os resultados demonstram que os animais estavam seguramente livres de disbiose, com ótima distribuição de espécies definidas como importantes na mensuração quantitativa, e baixa presença quantitativa de espécies indesejadas. Vale lembrar que acrescentamos valores ideais, na variância aceita, a fim de exigir maior qualidade dos doadores. Alguns valores ficaram fora da faixa ideal, o que não desqualificou o doador, mas serviu apenas de parâmetro de máxima exigência e qualidade.

Quadro 9: Resultados do painel microbiológico das fezes dos doadores. Exames realizados no laboratório de gastrologia veterinário Stonewell, segundo painel de disbiose da A&M Texas

	Espécie	Resultado log	Referência	Ideal
Doador Thor	<i>Faecalibacterium</i>	6,9	3,4 - 8,0	Acima de 5,0
	<i>Turicibacter</i>	6,0	4,6 – 8,1	Acima de 6,0
	<i>Blautia</i>	10,0	9,5 – 11,0	Acima de 10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,0	7,0 – 10,3	Acima de 8,0
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,9	5,1 – 7,1	Acima de 6,0
	<i>Streptococcus</i>	3,0	1,9 – 8,0	Abaixo de 5,0
	<i>E. coli</i>	4,0	0,9 – 8,0	Abaixo de 4,0
	Total bactérias	10,8	10,6 – 11,4	10,9
Doador Fred	<i>Faecalibacterium</i>	6,6	3,4 - 8,0	Acima de 5,0
	<i>Turicibacter</i>	7,3	4,6 – 8,1	Acima de 6,0
	<i>Blautia</i>	10,0	9,5 – 11,0	Acima de 10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,9	7,0 – 10,3	Acima de 8,0
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,4	5,1 – 7,1	Acima de 6,0
	<i>Streptococcus</i>	5,8	1,9 – 8,0	Abaixo de 5,0
	<i>E. coli</i>	4,7	0,9 – 8,0	Abaixo de 4,0
	Total bactérias	11,5	10,6 – 11,4	10,9
Doador Chico	<i>Faecalibacterium</i>	6,9	3,4 - 8,0	Acima de 5,0
	<i>Turicibacter</i>	5,0	4,6 – 8,1	Acima de 6,0
	<i>Blautia</i>	10,1	9,5 – 11,0	Acima de 10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,1	7,0 – 10,3	Acima de 8,0
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,9	5,1 – 7,1	Acima de 6,0
	<i>Streptococcus</i>	2,8	1,9 – 8,0	Abaixo de 5,0
	<i>E. coli</i>	1,4	0,9 – 8,0	Abaixo de 4,0
	Total bactérias	9,6	10,6 – 11,4	10,9
Doadora Lorraine	<i>Faecalibacterium</i>	5,9	3,4 - 8,0	Acima de 5,0
	<i>Turicibacter</i>	6,6	4,6 – 8,1	Acima de 6,0
	<i>Blautia</i>	10,3	9,5 – 11,0	Acima de 10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,3	7,0 – 10,3	Acima de 8,0
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,5	5,1 – 7,1	Acima de 6,0
	<i>Streptococcus</i>	5,0	1,9 – 8,0	Abaixo de 5,0
	<i>E. coli</i>	4,3	0,9 – 8,0	Abaixo de 4,0
	Total bactérias	10,7	10,6 – 11,4	10,9
Doador Bhor	<i>Faecalibacterium</i>	6,3	3,4 - 8,0	Acima de 5,0
	<i>Turicibacter</i>	7,1	4,6 – 8,1	Acima de 6,0
	<i>Blautia</i>	10,0	9,5 – 11,0	Acima de 10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,8	7,0 – 10,3	Acima de 8,0
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,2	5,1 – 7,1	Acima de 6,0
	<i>Streptococcus</i>	5,7	1,9 – 8,0	Abaixo de 5,0
	<i>E. coli</i>	4,5	0,9 – 8,0	Abaixo de 4,0
	Total bactérias	10,5	10,6 – 11,4	10,9
Doador Odin	<i>Faecalibacterium</i>	6,1	3,4 - 8,0	Acima de 5,0
	<i>Turicibacter</i>	5,2	4,6 – 8,1	Acima de 6,0
	<i>Blautia</i>	10,5	9,5 – 11,0	Acima de 10,0
	<i>Fusobacterium</i>	8,4	7,0 – 10,3	Acima de 8,0
	<i>Clostridium hiranonis</i>	6,3	5,1 – 7,1	Acima de 6,0
	<i>Streptococcus</i>	7,8	1,9 – 8,0	Abaixo de 5,0
	<i>E. coli</i>	5,4	0,9 – 8,0	Abaixo de 4,0
	Total bactérias	10,6	10,6 – 11,4	10,9

Fonte: Do autor (2024).

O Quadro 9, referente as análises e resultados de sequenciamento do gene 16sRNA, obtidos dos doadores, pode ser comparado e conferido com o painel de eubiose, desenvolvido pela A & M Texas, e as justificativas científicas da importância de alguns táxons na fisiologia gastrointestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta, ativação de ácidos biliares, peristaltismo, trânsito intestinal, reabsorção de água, absorção.

Tabela 4: Intervalos de referência quantidade de bactérias para cães

Espécies	Função	Normal em cães
<i>Faecalibacterium</i>	Anti-inflamatório, produção de SCFA	3,4–8,0
<i>Turicibacter</i>	Produção de SCFA	4,6–8,1
Bláutia	Produção de SCFA	9,5–11,0
Fusobactéria	Produção de SCFA	7,0–10,3
Bifidobactéria	Produção de SCFA	Não medido
Bacteroides	Produção de SCFA	Não medido
<i>Clostridium Hiranonis</i>	Conversão de ácidos biliares primários em secundários	5,1–7,1
Estreptococo	Crescimento excessivo associado à disbiose	1,9–8,0
<i>E. coli</i>	Pró-inflamatório	0,9–8,0

Fonte: Sung *et al.* (2022).

* SCFA: Ácidos graxos de cadeia curta.

Nesta etapa, após a seleção prévia dos doadores e a coleta das fezes, foram realizados os sequenciamentos do rRNA 16S via Nanopore para a elaboração de um painel referencial da microbiota intestinal dos doadores, a partir de exames de sequenciamento genético das bactérias, a caracterização da microbiota de cada doador e a avaliação posterior da sua qualidade.

Os valores de proporção e do tipo de bactérias presentes na microbiota dos candidatos a doadores, um dos objetivos da pesquisa, foram avaliados, como descrito no Quadro 10. Com a análise de 6 amostras de fezes dos doadores verificou-se um padrão de composição da microbiota dos mesmos em relação às proporções de bactérias desejáveis (superior a 90%), e indesejáveis (inferior a 10%). A seguir, conforme Quadro 10, as bactérias predominantes no grupo desejável e indesejável, por espécie.

Os resultados obtidos foram excepcionais, uma vez que os doadores apresentaram um perfil de microbiota predominantemente composto por bactérias desejáveis, superior a 90%, enquanto as bactérias indesejáveis representaram menos de 10%. Além disso, os dados do microbioma mostraram-se consistentes com outras

análises e parâmetros dos indivíduos, incluindo escore fecal, idade, exames bioquímicos, hemograma e ultrassonografia abdominal.

É importante destacar que a similaridade nos resultados pode ser atribuída ao fato de os animais viverem no mesmo ambiente, e estarem sob o mesmo manejo alimentar e dieta. Além disso, o alto grau de parentesco e a homogeneidade genética entre os doadores podem ter contribuído para a uniformidade observada nas características da microbiota. Essa coesão nos fatores ambientais e genéticos reforça a relevância dos dados obtidos para o entendimento da microbiota intestinal em contextos semelhantes.

Quadro 10: Bactérias desejáveis e indesejáveis predominantes por espécie

Bactérias desejáveis (%)						
Bactérias espécies	Lorraine	Bhor	Odin	Thor	Fred	Chico
<i>Clostridium hiranonis</i>	44,34	40,00	42,12	38,44	35,55	39,89
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	15,46	15,80	14,60	10,90	12,10	11,11
<i>Turicibacter sanguinis</i>	8,80	9,80	8,00	6,40	7,89	9,12
<i>Blautia glucerasea</i>	4,87	6,99	5,00	3,88	2,88	1,99
<i>Blautia luti</i>	4,08	3,65	3,00	2,88	3,00	2,22
<i>Blautia hansenii</i>	3,96	3,00	3,96	5,77	3,89	4,12
<i>Blautia producta</i>	1,90	1,90	2,22	2,34	1,28	2,09
<i>Blautia schinkii</i>	3,40	3,00	2,40	2,99	7,15	6,21
<i>Blautia argi</i>	1,42	3,22	4,44	3,33	1,45	2,66
<i>Blautia wexlerae</i>	2,20	1,99	2,98	5,00	2,22	3,66
<i>Blautia hominis</i>	1,80	2,22	0,95	3,44	6,88	2,77
<i>Blautia coccooides</i>	1,90	1,10	2,90	0,44	1,22	2,66
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1,50	0,90	3,27	2,09	3,99	1,08
<i>Prevotella copri</i>	1,89	0,90	2,38	4,10	1,99	2,33
Bactérias indesejáveis (%)						
<i>Streptococcus equinus</i>	1,00	1,20	0,00	1,40	2,29	3,12
<i>Escherichia coli</i>	1,00	1,20	1,00	3,00	1,00	2,68
<i>Estreptococcus</i>	0,48	0,45	0,78	2,60	2,00	0,41

Fonte: Do autor (2024).

Os resultados obtidos confirmam a alta segurança em relação à qualidade dos enemas fecais durante o preparo e congelamento do material, assegurando o cumprimento dos objetivos propostos. A produção de enemas fecais, com a finalidade de revitalizar microbiomas disfuncionais, deve seguir critérios rigorosos, que incluem a análise detalhada do perfil da microbiota intestinal do doador, com ênfase na

proporção e diversidade das espécies identificadas por meio de sequenciamento do RNA 16S.

Essa avaliação deve ser complementada por uma análise quantitativa da disbiose, além de exames clínicos, bioquímicos e histórico alimentar do doador, incluindo manejo prévio e controle diário. A realização de transplantes sem um armazenamento rigorosamente selecionado em um biobanco, apresenta desafios logísticos e financeiros significativos, tornando essa abordagem inviável. A falta das devidas condutas pode acarretar riscos elevados.

Em outras palavras, a utilização de um doador apenas com base na suposição simplista de que ele é saudável, evidenciado por um bom escore fecal, não garante adequação do material para o transplante. Tal prática pode resultar em desfechos insatisfatórios e até agravar a condição do receptor. Portanto, é imperativo adotar protocolos rigorosos para assegurar a eficácia e segurança dos transplantes fecais.

4.7 SOBRE A DIETA DOS DOADORES

É esperado que animais alimentados por mais de 30 dias com adequados teores de fibra na ingestão total da dieta, contendo fibras de modulada fermentação e ausência de alimentos crus, tenham razoável produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), como butirato, acetato e propionato (Thorburn *et al.*, 2015).

A dieta alimentar do animal tem influência na microbiota e em seus metabólitos, afetando a incidência de processos alérgicos e inflamatórios. A produção de acetato reduz manifestações alérgicas por meio da modulação das células T-reguladoras. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) também promovem a proliferação de células progenitoras neurais em humanos, cães e camundongos. Além de fornecer nutrientes, os AGCCs desempenham papéis reguladores, interagindo com receptores específicos como o FFAR, modulando processos inflamatórios imunomediados (Yang; Millischer, 2020).

Os AGCCs, ao se ligarem a receptores acoplados à proteína G (GPCRs), regulam processos celulares como a secreção de insulina e efeitos anti-inflamatórios. O FFAR1 é ativado por ácidos graxos de cadeia média e longa, e o FFAR4, por ácidos graxos ômega-3. Receptores como o FFAR2 e FFAR3, sensíveis aos AGCCs, têm ligantes com diferentes afinidades, sendo o propionato e o butirato mais potentes para FFAR3 (Grundmann; Bender, 2021).

O butirato é particularmente destacado por seu papel na fisiologia do hospedeiro, estimulando a termogênese, a oxidação de ácidos graxos e a sinalização AMPK, além de atuar no sistema nervoso, regulando o sistema simpático, a neurogênese hipocampal e a própria ingestão de alimentos (saciedade). Ele também inibe desacetilases (HDACs), promovendo a acetilação de histonas e influenciando a plasticidade neuronal e a memória, além de restaurar funções cognitivas e reverter déficits neurocognitivos (Donohoe, Garge; Zhang, 2011).

Microrganismos produtores de butirato pertencem ao filo Firmicutes, incluindo bactérias dos *clusters Clostridium*. Esses microrganismos estão presentes nas fezes de cães, com gêneros como *Clostridium* e taxons de *Clostridium hiranonis*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia*, que sintetizam butirato, principalmente pela via butiril-CoA transferase (Louis, Flint, 2017).

Todos os seis doadores selecionados para o estudo receberam a mesma dieta por 90 dias, antes e após as coletas, e permaneceram consumindo a mesma. sendo ração comercial para animais adultos hígidos (Tabela 5), que especifica os principais valores nutricionais informados pelo fabricante. A referida ração foi eleita por possuir bons valores de fibra, conter amidos resistentes e modulada quantia de proteína e gorduras.

Tabela 5: Níveis nutricionais da dieta dos doadores

Níveis nutricionais da dieta	Valores em 1000g
Energia metabolizável	3.600 kcal
Proteína bruta	190g
Extrato etéreo	120g
Fibra bruta	60g
Matéria seca	900g
Extrato não nitrogenado	430g
Relação cálcio/fósforo	1,42g
Ferro	70mg
Sódio	2g
Cálcio	10mg
Fósforo	7mg
Matéria mineral total	100g
Umidade	100g

Fonte: Do autor (2024).

Os animais foram alimentados 2 vezes ao dia com somente este alimento. Dos 6 doadores, 3 ficaram sob absoluto controle diário do pesquisador, pois são criados

em seu canil. Os outros 3 doadores receberam orientações semanais e também tiveram visitas quinzenais. Vale dizer que foram utilizadas apenas material dos animais que estavam com supervisão em tempo integral. O cálculo de consumo foi estabelecido com base na fórmula:

- a. Peso do animal em Kg
- b. Necessidade energética de manutenção (NEM):
- c. $NEM = 95 \times (\text{peso em kg})^{0,75}$
- d. NEM = Kcal por dia
- e. $Kcal / \text{Energia metabolizável da dieta} = \text{consumo diário}$.

Tabela 6: Consumos individuais diários dos doadores

Doador	Peso em Kg	Consumo diário em g	Consumo diário de fibras
Lorraine	25	290	17,4
Odin	30	340	20,4
Bhor	22	270	16,2
Thor	28	320	19,2
Fred	26	300	18,0
Chico	27	310	18,6

Fonte: Do autor (2024).

* Proporcionalmente ao peso metabólico, é como uma pessoa de 75kg, consumindo 50g de fibra ao dia.

4.8 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ENEMA FECAL

Os animais doadores foram mantidos sob cuidados e monitoramento contínuo durante todo o período experimental, receberam alimentação em duas refeições diárias, às 8h e 18h, com acesso a água fresca e limpa, disponível em quatro bebedouros distribuídos no espaço do canil. Os animais dispunham de um espaço livre de 250 metros quadrados, que incluía uma ampla área para atividades e um local reservado para descanso. O comportamento dos animais e a aparência das fezes foram avaliados diariamente, bem como qualquer manifestação clínica, como hiporexia, prostração ou sinais de dor. Durante todo o experimento, os animais mantiveram-se alertas e ativos.

O material coletado dos doadores Lorraine, Odin e Bhor foram devidamente rotulados com data da coleta e código do doador para o armazenamento em

recipientes específicos (falcon de 50 mL), constituído por 55g de fezes acrescidas de 10% de glicerol (5,5 mL). As amostras das fezes coletadas dos doadores foram preparadas para armazenamento em ultra freezer a -80°C , de modo que puderam ser conservadas para a etapa de análise do sequenciamento genético das bactérias presentes.

Nesta etapa foram definidas as diluições mais adequadas, metodologia de preparo dos enemas fecais, posologia com base no peso dos receptores, controle de qualidade e segurança, registro das informações para a rastreabilidade dos lotes, e embalagem para o armazenamento seguro, com o objetivo de garantir a manutenção do material biológico, seguido do acompanhamento da qualidade do enema armazenado em função do tempo.

O método de preparo do material fecal para transplante é descrito a seguir, conforme ilustrado na Figura 23. O material foi coletado do doador, que defeca em um piso de cimento liso, limpo, mas sem a utilização de desinfetantes. Inicialmente, é realizada a avaliação do escore de fezes e da umidade. Em um processo de produção em alta escala, o ideal seria a utilização de um aparelho de mensuração da umidade e consistência em tempo real para garantir um padrão e a qualidade do material.

Após essa avaliação, o material é peneirado para a remoção de resíduos indesejáveis, como restos alimentares, pelos e outros. Em seguida, o material é pesado e adicionado glicerol a 10%, sendo então acondicionado em tubos Falcon de 50 mL, com peso variando entre 70 e 75 gramas. Os tubos são devidamente identificados (rotulados com data da coleta e doador), organizados em lotes e catalogados com a data de validade (a definir), antes de serem congelados a -80°C em um ultrafreezer.

Para a realização do transplante, o material passa por um processo de descongelamento que ocorre ao longo de 12 horas, em um freezer a -20°C , após ter sido armazenado no ultrafreezer a -80°C . Em seguida, realiza-se a diluição do material em solução salina, até alcançar a consistência e viscosidade desejadas.

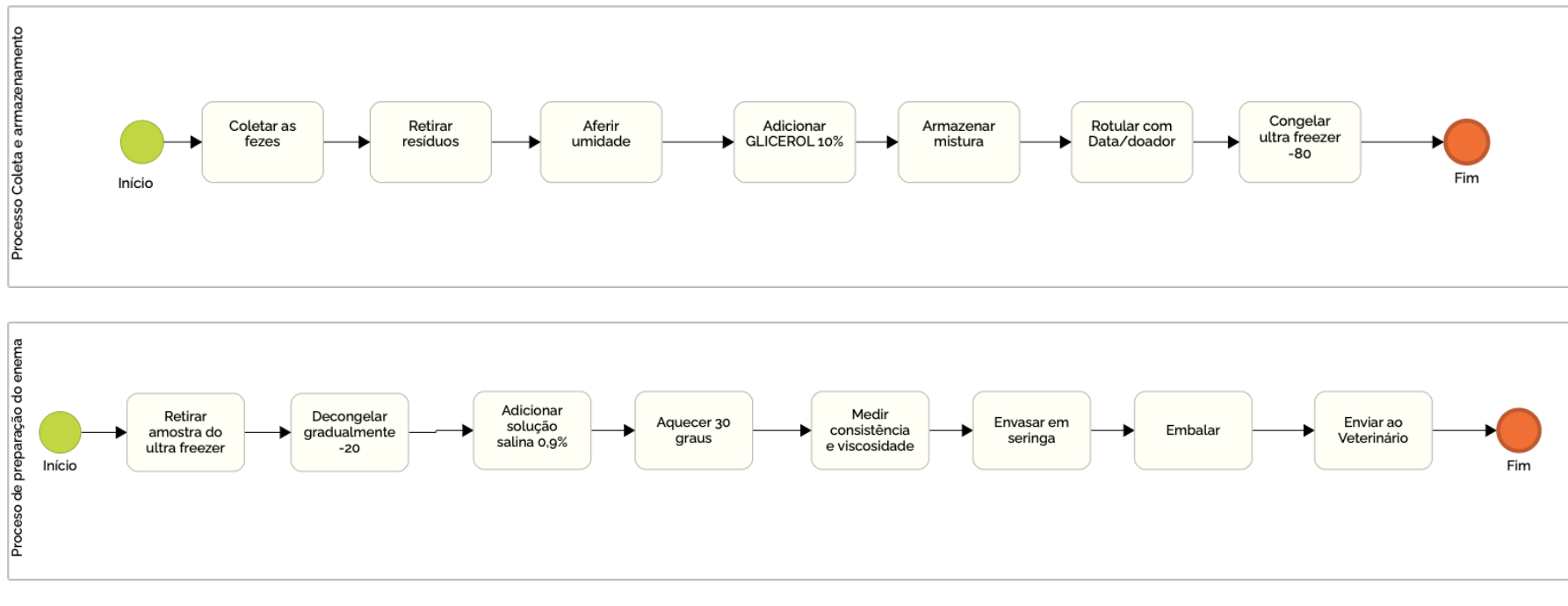
Finalmente, as seringas são preenchidas com os respectivos volumes finais, determinados com base no peso do paciente. O resultado final estabelece uma posologia da solução diluída, variando entre 4 e 7 mL por kg de peso vivo do paciente.

A Figura 23 descreve o desenho do processo de coleta das fezes, do doador selecionado pelos critérios de avaliação, preparação para armazenamento em ultra

freezer. Quando é solicitado uma amostra para o TMF, o material é descongelado e preparado para o envio ao veterinário solicitante.

Foi elaborado um Procedimento Operacional Padrão (POP), com o objetivo de garantir o controle de qualidade dos enemas produzidos em laboratório. Este procedimento teve como objetivo garantir a excelência do produto, considerando uma produção futura em escala, e encontra-se descrito no Apêndice G.

Figura 23: Processo de coleta das fezes, preparação, armazenamento e envio do enema fecal



Fonte: Do autor (2024).

4.9 SELEÇÃO DE RECEPTORES DO TMF

A partir de 15 de agosto de 2024 foram selecionados os receptores. O Quadro 11 descreve os cães com doenças dermatológicas em que seus responsáveis aceitaram que participassem do estudo. A maioria dos cães são de pequeno porte, com dominância para a raça Shih tzu, com idade média de 5 a 6 anos, e peso médio de 10,7 kg. Esses animais formaram o Grupo Dermato de receptores. Todos os animais receberam 3 infusões, e os transplantes foram realizados no Hospital VFP - Araraquara, pelo médico veterinário e cirurgião Dr. Rodrigo Henrique Borissi Caetano.

Quadro 11: Receptores com injúrias dermatológicas

Número	Nome	Raça	Idade	Peso	mL/Kg	mL
01	Noha	Bulldog F	4	14,0	6,5	91
02	Francisco	Bulldog F	5	14,0	6,5	91
03	Barto	Amer B	2	22,0	5,0	110
04	Argos	Bulldog F	6	14,0	6,5	91
05	Charlot	Shih tzu	5	8,2	6,5	53
06	Pingo	Shih tzu	7	7,0	6,5	45
07	Tody	Shih tzu	6	7,0	6,5	45
08	Nina	Shih tzu	8	7,0	6,5	45
09	Margot	Shih tzu	6	7,0	6,5	45
10	Aila	Shih tzu	7	7,0	6,5	45

Fonte: Do autor (2024).

O Quadro 12 descreve os cães com doenças gastrointestinais em que seus responsáveis aceitaram que participassem do estudo. Os cães são de tamanhos, peso e idade variados. Esses animais formaram o Grupo Gastro de receptores. Todos os animais receberam 3 infusões e os transplantes foram realizados no Hospital VFP, unidade Araraquara, pelo médico veterinário e cirurgião Dr. Rodrigo Henrique Borissi Caetano.

Quadro 12: Receptores com injúrias gastrointestinais

Número	Nome	Raça	Idade	Peso	mL/Kg	mL
01	Midari	Shih tzu	4	5,0	6,5	30
02	Cacau	Shih tzu	5	6,0	6,5	40
03	Verde	Rott	60 dias	5,0	6,5	30
04	Miuda	Rott	60 dias	4,0	6,5	25
05	Lala	SRD	12	10,0	6,5	65
06	Theo	Shih tzu	9	6,0	6,5	40
07	Maggin	Bulldog F	2	12,0	6,5	80
08	Lolla	Shih tzu	11	6,0	6,5	40
09	Lebron	SRD	12	12,0	6,5	80
10	Carol	Shih tzu	5	5,0	6,5	30

Fonte: Do autor (2024).

Tanto nos casos gastrointestinais como dermatológicos foram bem caracterizadas as respectivas diferenciações das manifestações clínicas, comparadas com animais hígidos, via laudo médico inerente e histórico do animal. Em complementação aos laudos, foi encaminhado aos tutores um questionário anamnésico, descrito no Apêndice C, com o objetivo da caracterização das referidas doenças.

Os animais considerados aptos ao estudo pelo critério definido na subseção 3.2.5.1, que fizeram uso de antibiótico, puderam participar do estudo, após a confirmação do responsável de que em um período de no mínimo 30 dias, o animal permaneceu sem uso e necessidade do antibiótico.

4.10 O PROCEDIMENTO DE TRANSPLANTE FECAL

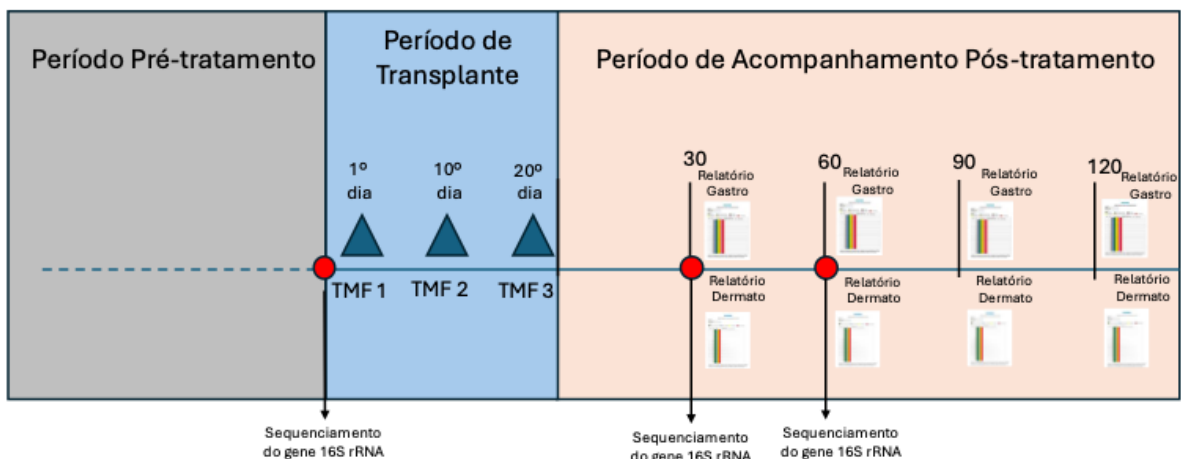
O agendamento para o TMF é realizado conforme a disponibilidade do tutor em acordo com a agenda do hospital. O estudo prevê a realiação de três transfusões em intervalos de 10 dias entre elas (Figura 24). Para todos os pacientes que participaram do experimento, foi realizado uma avaliação do estado de saúde antes do transplante, e depois do transplante. Este acompanhamento da saúde do paciente seguiu até 120 após o primeiro transplante.

O procedimento de transplante fecal foi conduzido conforme protocolo padronizado, garantindo sua reprodutibilidade e segurança. Os pacientes permaneceram em jejum alimentar por 12 horas e foram estimulados a defecar cerca

de 10 horas antes do transplante, por meio de caminhada controlada. Para uniformizar o manejo, todos os procedimentos ocorreram às 9h. Na admissão hospitalar, os animais foram novamente estimulados a evacuar, reduzindo o risco de obstrução da sonda retal por fezes remanescentes na ampola retal. Após a infusão do material fecal, os pacientes permaneceram em observação por três horas, com restrição de movimentos para minimizar refluxo. Além disso, foram utilizadas fraldas humanas como medida adicional para desencorajar a defecação precoce e assegurar a eficácia do procedimento.

Os animais tratados foram acompanhados por meio de relatos dos responsáveis, que mantiveram contato semanal. As rotinas dos animais foram mantidas consistentes com o período anterior à avaliação, garantindo a continuidade das condições experimentais.

Figura 24: Resumo do procedimento experimental



Fonte: Do autor (2024).

O método 16S rRNA Nanopore foi aplicado para avaliar as amostras de fezes dos pacientes com dermatite e inflamação intestinal crônica. Foram avaliados 10 animais de cada grupo, com análises realizadas em três momentos: antes do transplante, 30 e 60 dias após, como ilustra a figura 24.

Os dados demonstraram que, após 60 dias do transplante, a microbiota intestinal dos pacientes de ambos os grupos (dermatite e gastrointestinais), passou por uma transformação significativa no perfil bacteriano. Houve uma redução na proporção de bactérias indesejáveis e um aumento nas bactérias desejáveis. Além disso, nota-se que o microbioma dos animais transplantados passou a assemelhar-se com o microbioma dos doadores.

Os dados confirmam que o transplante foi eficaz na transformação e recolonização dos microbiomas dos receptores, mantendo-se estável durante o período analisado. A alteração do microbioma pode estar associada à redução das inflamações e reações alérgicas observadas nos pacientes, uma vez que, ao longo de 120 dias de acompanhamento clínico, foram detectadas melhorias significativas nos sinais clínicos apresentados pós transplante fecal.

Após o transplante, o cão receptor foi monitorado pelo pesquisador/veterinário, por um período de 120 dias do primeiro procedimento de transplante, registrando qualquer tipo de ocorrência, para garantir a total segurança do animal, e para que seja avaliado o benefício e manutenção do resultado esperado.

Ao término dos três transplantes, com intervalos de 10 dias entre cada transplante, uma nova coleta das fezes dos pacientes foi solicitada aos respectivos tutores, para reavaliação da microbiota dos animais transplantados, por meio de um novo sequenciamento do rRNA 16S, que foi comparado com os exames iniciais.

4.11 GRUPO GASTRO

O grupo gastro foi composto por 10 animais que realizaram diagnóstico clínico de lesão crônica, com base nos sintomas observados e na avaliação médica. Os gráficos a seguir ilustram as alterações no perfil do microbioma dos animais durante o período de avaliação. Observa-se uma redução na proporção de bactérias indesejáveis e um aumento na participação de bactérias desejáveis. Essa mudança no microbioma acompanhou, ao longo do tempo, uma melhora clínica dos pacientes tratados. Conforme Tabela 7, é descrita a estatística das principais bactérias avaliadas que resultaram das análises do sequenciamento do gene rRNA 16S do grupo gastroentérico tratado.

Tabela 7: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias dos pacientes gastroentéricos

Bactéria	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Maximo
<i>Clostridium hiranonis</i>	0-antes	1,205	1,135	0	1	3,1
	30 dias pós	48,68	7,18	38	49,25	61
	60 dias pós	52,13	6,65	41,70	52,22	64,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0-antes	15,47	15,35	1	12,05	57
	30 dias pós	0,709	0,56	0	0,83	1,8
	60 dias pós	0,11	0,2807	0	0	0,9
<i>Blautia hansenii</i>	0-antes	1,522	1,644	0	1,35	5,30
	30 dias pós	10,463	2,239	7,9	9,99	14,80
	60 dias pós	11,648	3,047	7,9	11,00	17,89
<i>Faecalimonas umbilicata</i>	0-antes	8,79	9,78	0	5,00	28,50
	30 dias pós	2,53	1,198	0	2,80	4,20
	60 dias pós	1,206	0,653	0	1,20	2,00
<i>Clostridium disporicum</i>	0-antes	5,84	4,71	0	4,30	14,80
	30 dias pós	5,81	4,25	1,80	3,00	12,10
	60 dias pós	2,76	2,479	0,44	1,65	8,12
<i>Enterococcus faecalis</i>	0-antes	7,17	5,52	0,97	7,10	18,46
	30 dias pós	4,252	1,988	1,80	4,05	7,22
	60 dias pós	1,441	1,352	0,00	0,99	3,99
<i>Escherichia coli</i>	0-antes	26,28	15,61	0,0	26,80	52,00
	30 dias pós	3,199	1,577	1,80	2,71	6,28
	60 dias pós	1,187	0,623	0,00	1,00	2,00
<i>Blautia glucerasea</i>	0-antes	1,023	1,182	0,0	0,505	2,90
	30 dias pós	5,156	1,762	2,90	5,345	7,70
	60 dias pós	15,37	6,04	4,34	17,92	21,70
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0-antes	4,15	6,61	0,00	1,83	22,00
	30 dias pós	3,052	1,189	1,09	2,94	4,52
	60 dias pós	1,465	1,103	0,00	1,345	3,22
<i>Terrisporobacter mayombe</i>	0-antes	2,82	3,42	0,00	2,25	11,36
	30 dias pós	2,629	1,681	0,00	2,275	5,00
	60 dias pós	1,910	1,573	0,00	2,085	3,90
<i>Streptococcus lutetiensi</i>	0-antes	13,24	13,58	2,90	6,89	42,10
	30 dias pós	2,497	1,019	0,69	2,455	4,040
	60 dias pós	2,286	0,927	0,59	2,11	4,040
<i>Staphylococcus felis</i>	0-antes	1,203	1,101	0,00	1,35	3,030
	30 dias pós	2,777	2,989	0,00	1,775	10,00
	60 dias pós	2,347	1,822	0,00	2,040	5,75
<i>Enterobacter cancerogenu</i>	0-antes	2,69	5,43	0,00	1,20	18,00
	30 dias pós	1,663	1,832	0,00	1,00	5,00
	60 dias pós	1,063	1,272	0,00	0,70	3,33

Fonte: Do autor (2024).

Na Tabela 8 descreve as estatísticas das bactérias desejadas e indesejadas, que resultaram das análises do sequenciamento do gene rRNA 16S, do grupo gastroentérico tratado.

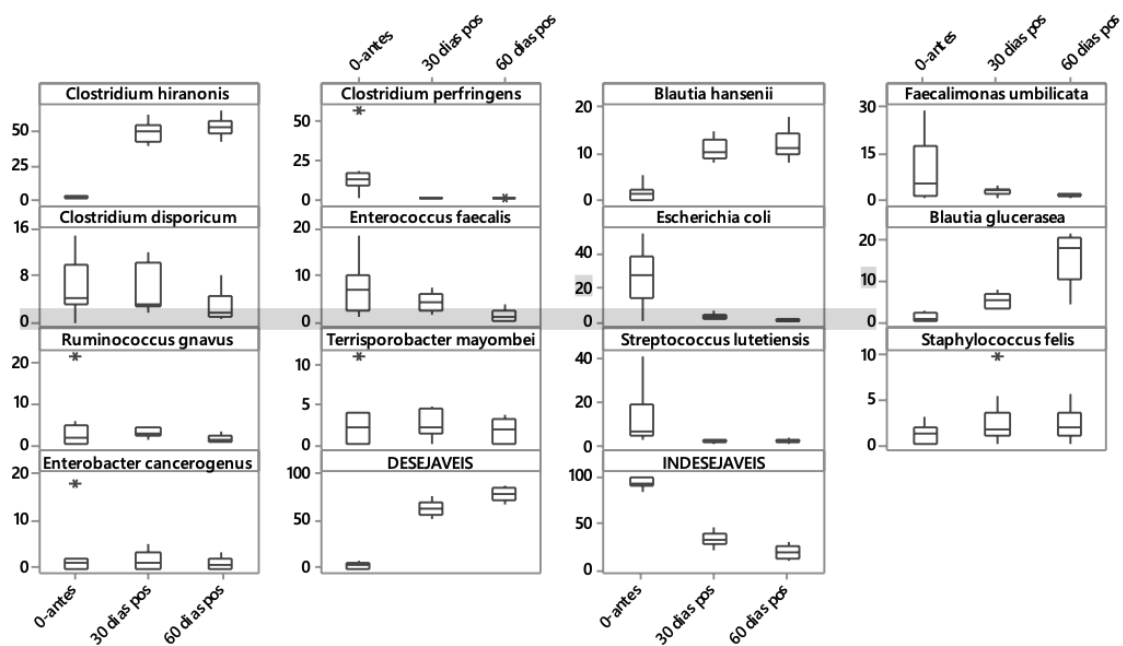
Tabela 8: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias desejáveis e indesejáveis para os pacientes gastroentéricos

Bactéria	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Maximo
DESEJÁVEIS	0-antes	3,75	2,913	0	4,48	8,300
	30 dias pós	64,30	7,55	52,33	64,55	77,29
	60 dias pós	79,14	6,88	67,82	80,06	88,16
INDESEJÁVEIS	0-antes	94,64	4,58	85,90	94,63	100,00
	30 dias pós	34,39	7,47	22,71	32,98	47,67
	60 dias pós	20,86	6,88	11,84	19,95	32,18

Fonte: Do autor (2024).

Nos Gráficos Box Plots – referente aos pacientes do grupo gastro (Figura 25), as espécies de bactérias desejáveis: *Clostridium hiranonis*, *Blautia hansenii*, *Blautia gluceracea*, estiveram presentes em maiores e crescentes proporções nas amostras analisadas após 60 dias do transplante. Avaliando o Box Plot para as bactérias desejáveis, pode-se verificar um notável aumento da média tanto para o período de 30 dias quanto para 60. E o Box Plot para as bactérias indesejáveis, pode-se verificar o processo inverso, ou seja, houve uma redução significativa das bactérias classificadas como indejeáveis.

Figura 25: Box-plots para as bactérias presentes no grupo gastroenterológicos



Fonte: Do autor (2024).

Como demonstrado na Tabela 9, os testes de análise de variância – ANOVA, para comparação das médias de bactérias antes da realização do transplante, após 30 dias e 60 dias. A análise de variância (ANOVA) foi selecionada por ser uma técnica estatística básica para determinar se as diferenças observadas entre as médias de várias amostras são significativas, e se refletiram diferenças reais nas populações de origem, ou se foram meramente casuais, os resultados da variabilidade amostral (Okoye; Hosseini, 2024). Os resultados pressupõem que as diferenças são indicativas de causas reais, no caso, houve mudança significativa na distribuição das bactérias no período observado.

Tabela 9: Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias de bactérias antes, 30 e 60 dias após o TMF - Nível de significância ($\alpha = 0,05$)

Bactéria	Transformação de variável	F-value	p-value	Resultado
<i>Clostridium hiranonis</i>	Raiz quadrada	408,98	0,000	Há diferença entre as medias de bactérias antes do TMF, 30 dias após e 60 dias após
<i>Clostridium perfringens</i>	Inverso	8,29	0,003	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Blautia hansenii</i>	Sem transformação	54,07	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Faecalimonas umbilicata</i>	Inverso	8,30	0,002	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Clostridium disporicum</i>	Sem transformação	2,03	0,151	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Enterococcus faecalis</i>	Raiz quadrada	9,10	0,001	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Escherichia coli</i>	Log	117,38	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Blautia glucerasea</i>	Log	28,67	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Ruminococcus gnavus</i>	Inverso	1,21	0,314	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Terrisporobacter mayombeii</i>	Sem transformação	0,41	0,668	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Log	15,08	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Staphylococcus felis</i>	Sem transformação	1,47	0,247	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Log	15,08	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Log	0,31	0,735	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05

Fonte: Do autor (2024).

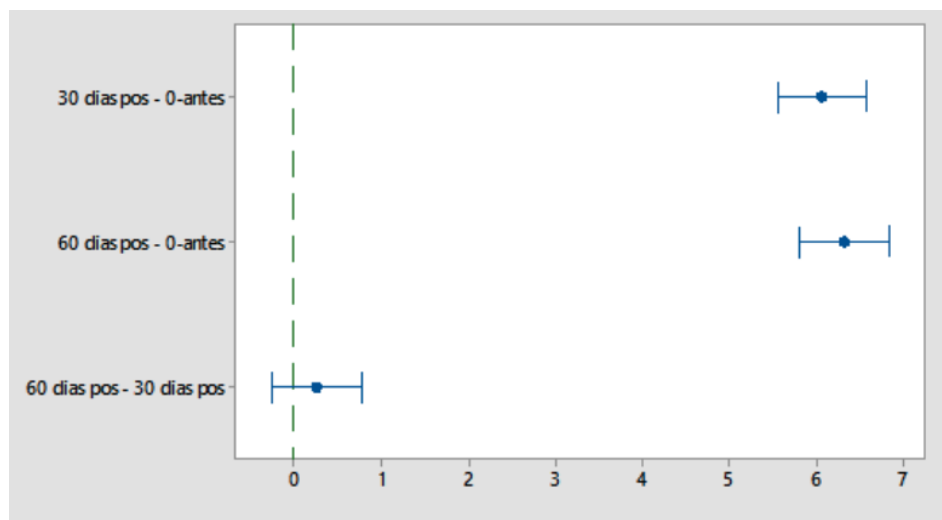
Para a aplicação da ANOVA foi necessário realizar uma transformação de variáveis, utilizando funções matemáticas como a raiz quadrada, logaritmo, para garantir o atendimento das suposições estatísticas.

A seguir, apresenta-se as comparações entre as médias, duas a duas, para verificar as diferenças. A forma gráfica dos testes de comparação são úteis por permitir a análise visual, que simplifica a avaliação.

As comparações foram entre a média antes do transplante, que tras as informações sobre a microbiota antes do procedimento, a média após 30 dias do transplante e a média 60 dias após o transplante. Assim, o interesse é verificar as diferenças entre as médias antes do transplante e após (30 e 60).

A figura 26 mostra grande diferença entre a média antes e 30 e a média antes e 60, indicando o efeito positivo do transplante.

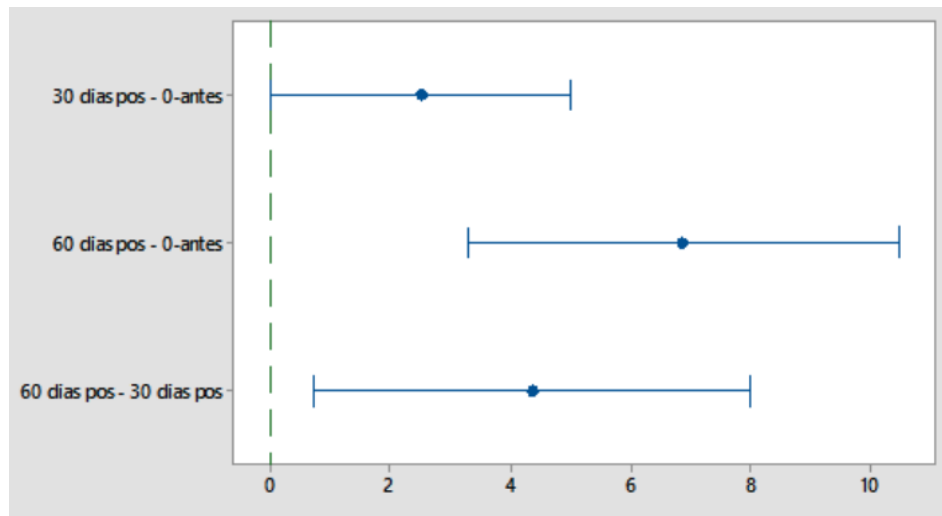
Figura 26: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Clostridium Hiranonis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 26, indica diferenças significativas entre a média de 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero, ou seja, o valor médio de μ_{30} é maior do que a média de μ_{antes}). Existem diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Também foram verificadas diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

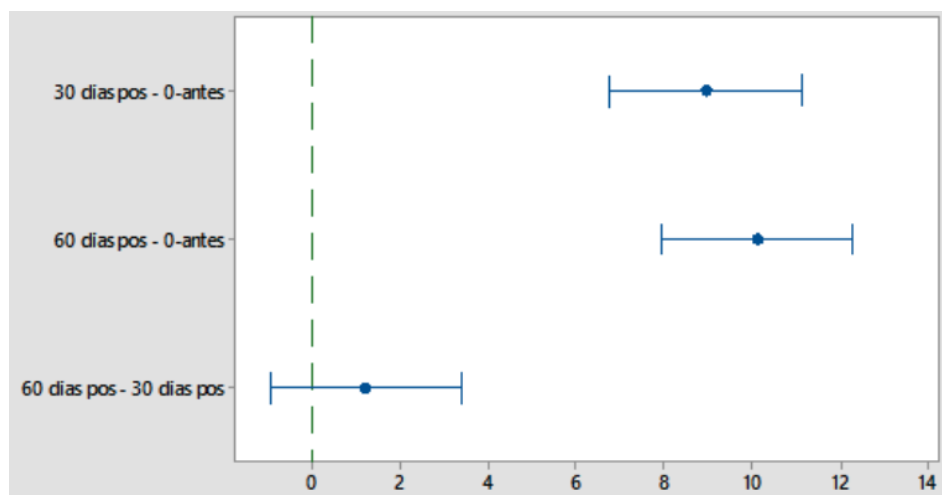
Figura 27: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Clostridium perfringens* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 27, indica que existem diferenças significativas entre a média de 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre média 60 dias e média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre média 60 dias e média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

Figura 28: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Blautia hansenii* dos pacientes

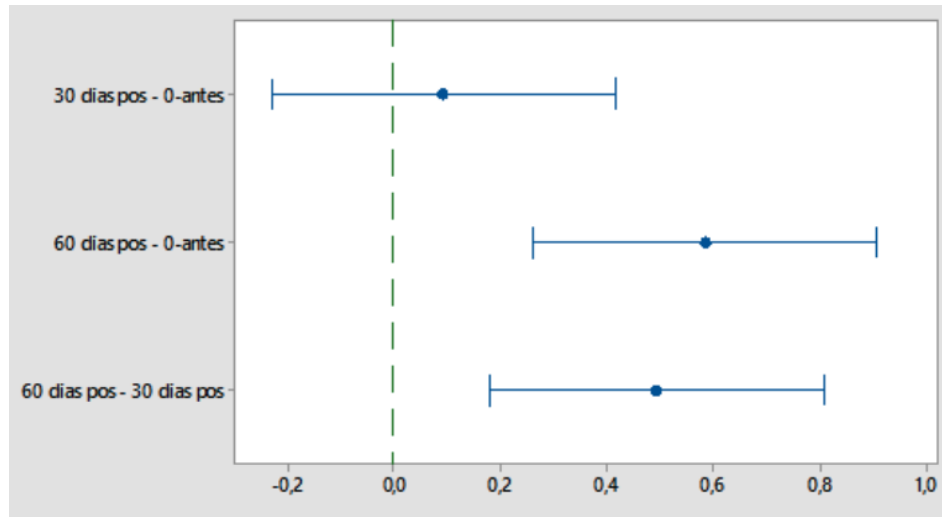


Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 28, indica diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o

valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

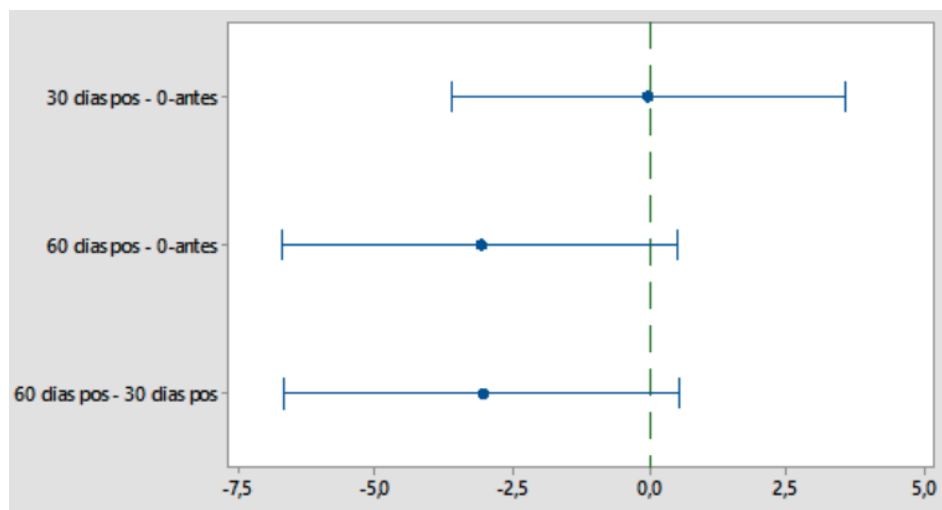
Figura 29: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Faecalimonas umbilicata* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 29, verificou diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

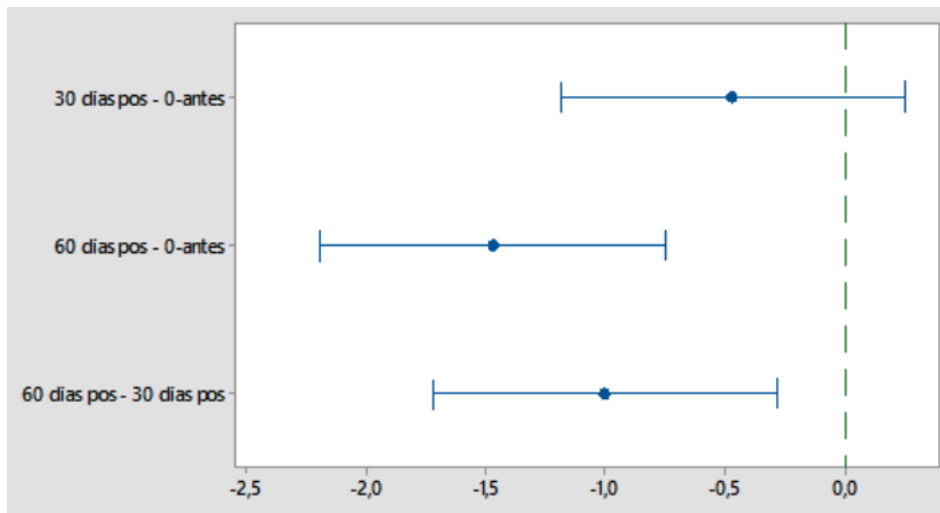
Figura 30: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Clostridium disporicum* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 30, verificou diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

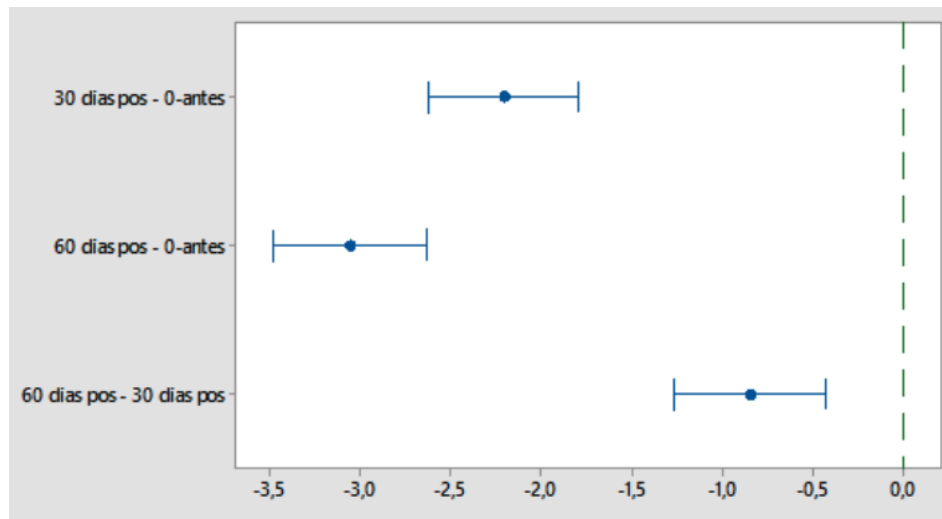
Figura 31: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Enterococcus faecalis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 31, verificou diferenças não significativas entre a média 30 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

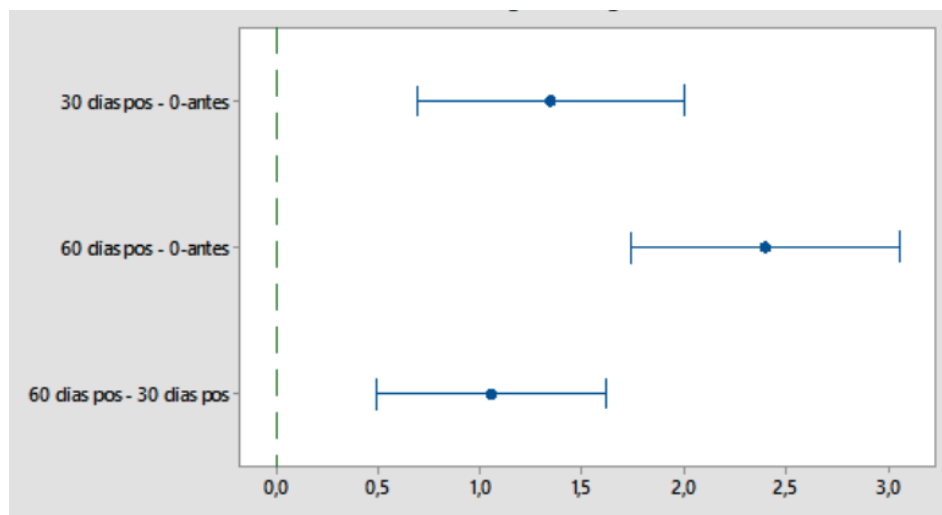
Figura 32: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Escherichia coli* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 32, verificou diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

Figura 33: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Blautia glucerasea* dos pacientes

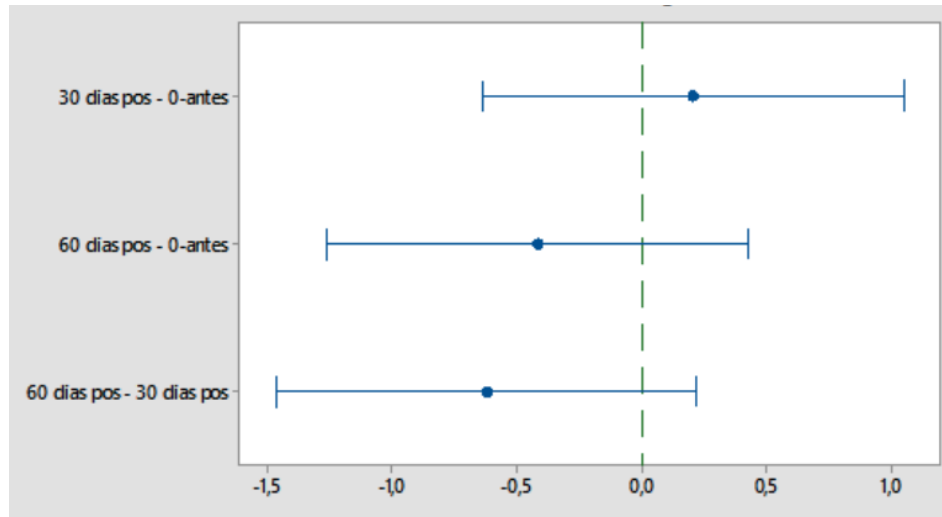


Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 33, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média

60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

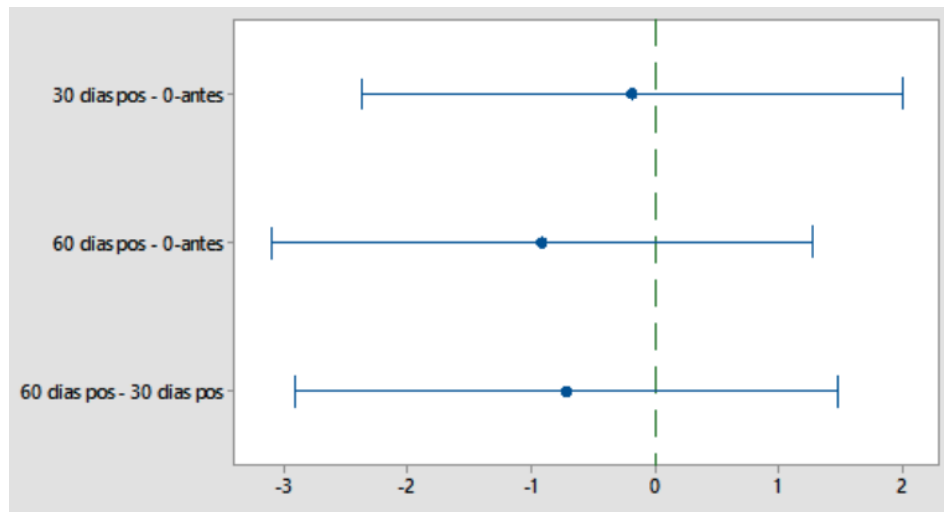
Figura 34: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Ruminococcus gnavus* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 34, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Verificou-se diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

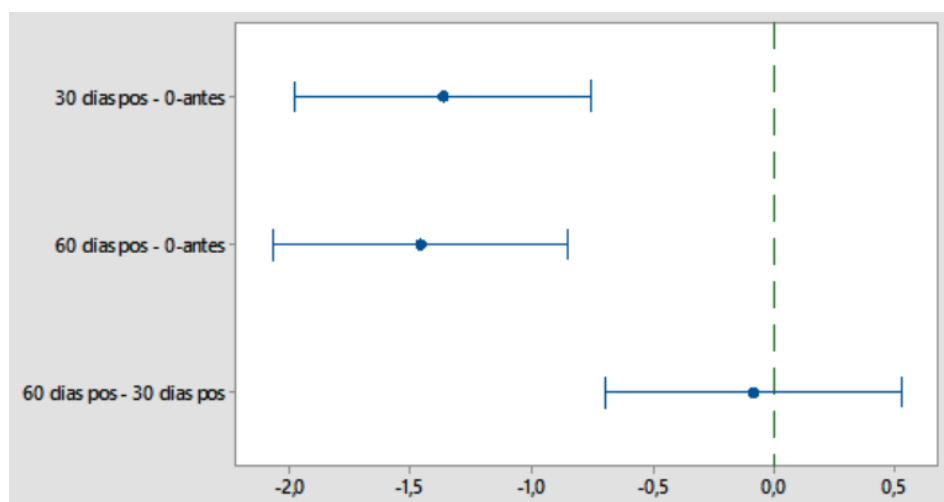
Figura 35: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Terrisporobacter mayombei* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 35, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

Figura 36: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Streptococcus lutetiensis* dos pacientes

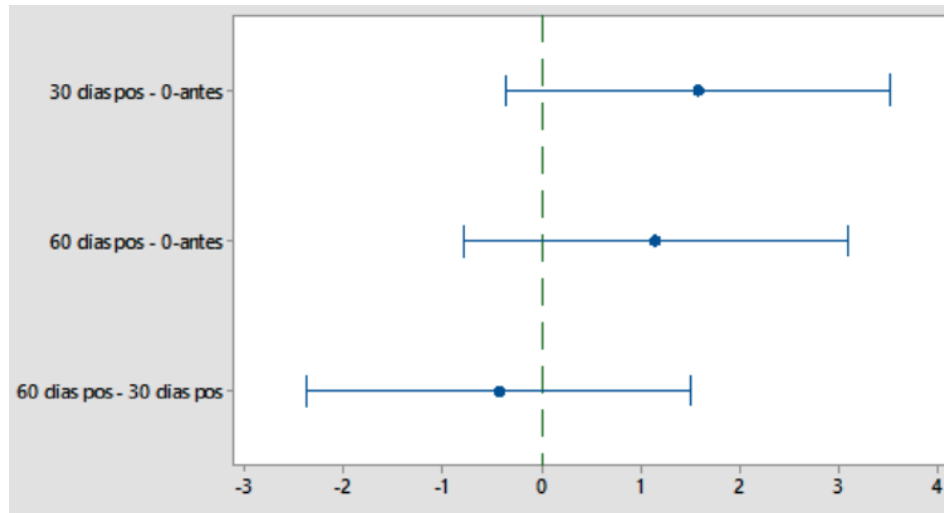


Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 36, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para

a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

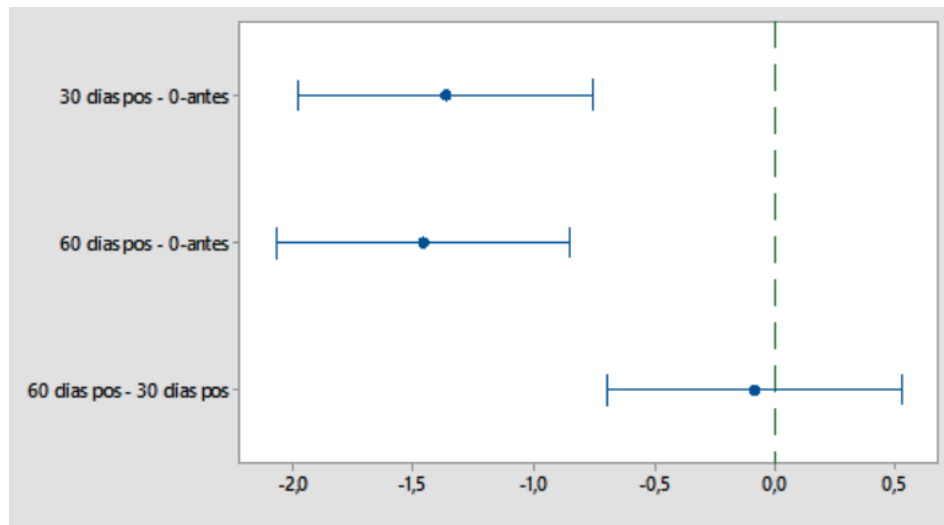
Figura 37: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Staphylococcus felis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 37, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

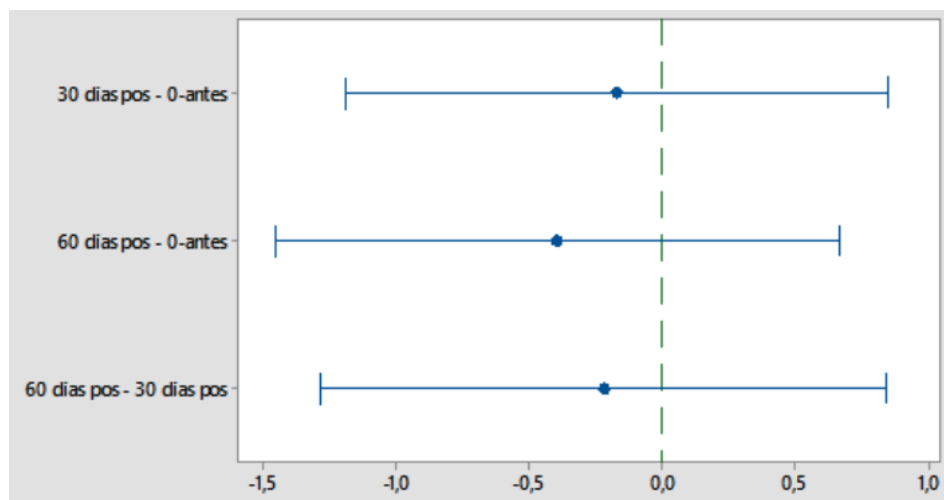
Figura 38: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Streptococcus lutetiensis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 38, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

Figura 39: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *Enterobacter cancerogenus* dos pacientes

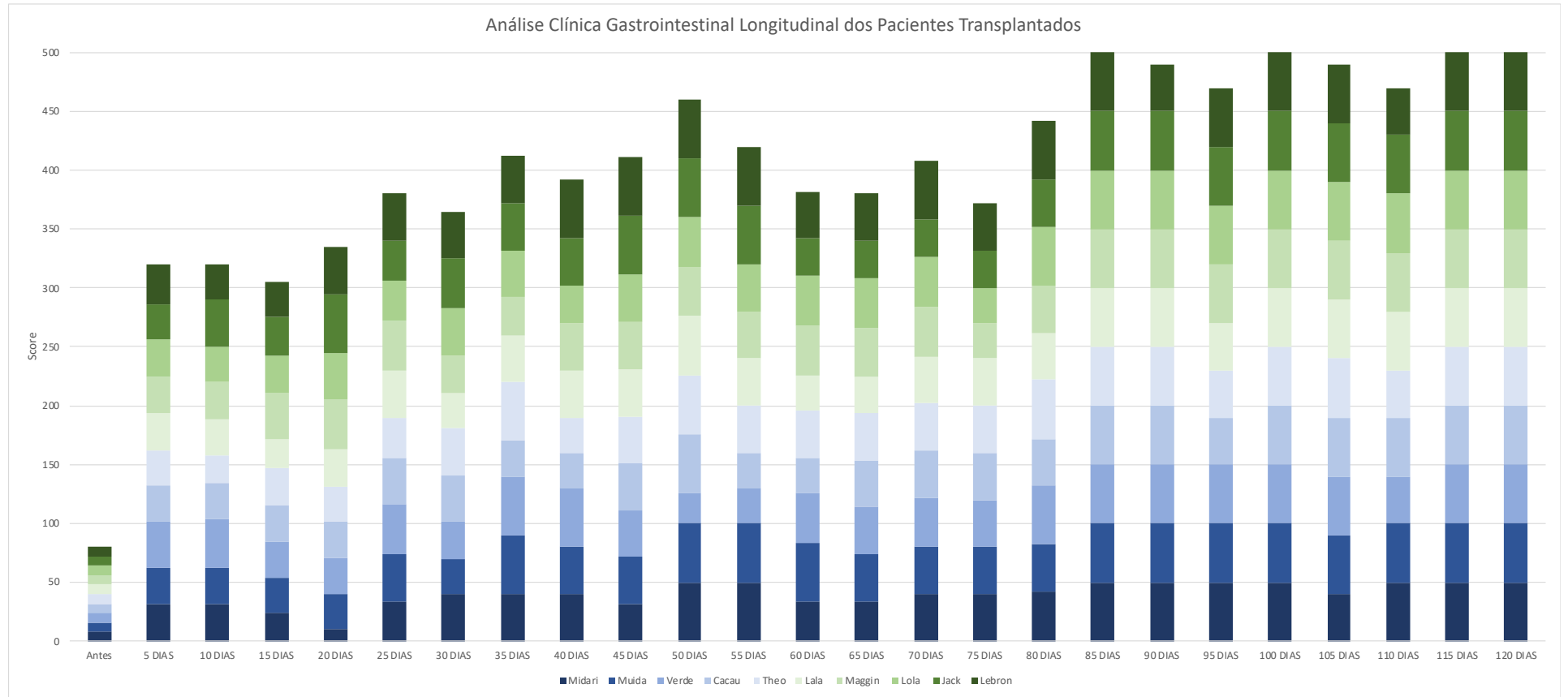


Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 39, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para

a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{Antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

Figura 40: Resultados clínicos longitudinais de pacientes gastro



Fonte: Do autor (2024).

A Figura 40 descreve o acompanhamento longitudinal dos pacientes transplantados, por um período de 120 dias após o primeiro transplante. É possível observar a evolução clínica dos pacientes gastro no transcorrer de 120 dias de observação. Conforme *score* de manifestação computado a cada 05 dias (soma dos pontos), o grupo gastro formado por 10 pacientes somou, aos 120 dias, a pontuação máxima de 500 pontos, ou seja, todos os indivíduos, nos últimos 5 dias, apresentaram fezes no *score* ideal, sem muco, com formato e nenhum relato de desconforto gastrointestinal. Comparando-se às manifestações clínicas antes do tratamento e após, no transcorrer dos 120 dias de observação, o grupo apresentou melhora das manifestações clínicas pós-transplantes.

A dieta dos pacientes manteve-se igual, sem alteração, antes e após o tratamento, sendo composta por alimentação natural, ajustada e formulada por nutrólogo veterinário, por meio do *Software* Supercraque 3.0. Os animais consumiram esta dieta 30 dias antes do início da terapia de TMF. Não receberam nenhuma medicação durante o tratamento, e as fichas de dados foram coletadas a cada 30 dias de observação. Durante a coleta de dados, os responsáveis pelos animais mantiveram contato semanal com o pesquisador, informando sobre a situação dos animais. Nenhum relato de hiporexia, êmese e prostração foi observado durante o período.

A melhora das condições clínicas no grupo Gastro foi mais rápida, se analisarmos os resultados do grupo Dermato, embora tenha apresentado maior oscilação durante o período. É variável o tempo para obtenção de maior estabilidade da nova microbiota, com melhora da fisiologia gastrointestinal, e da relação microbiota/intestino. As respostas são individuais para cada paciente, mesmo estando em condições clínicas semelhantes, e consumindo a mesma dieta.

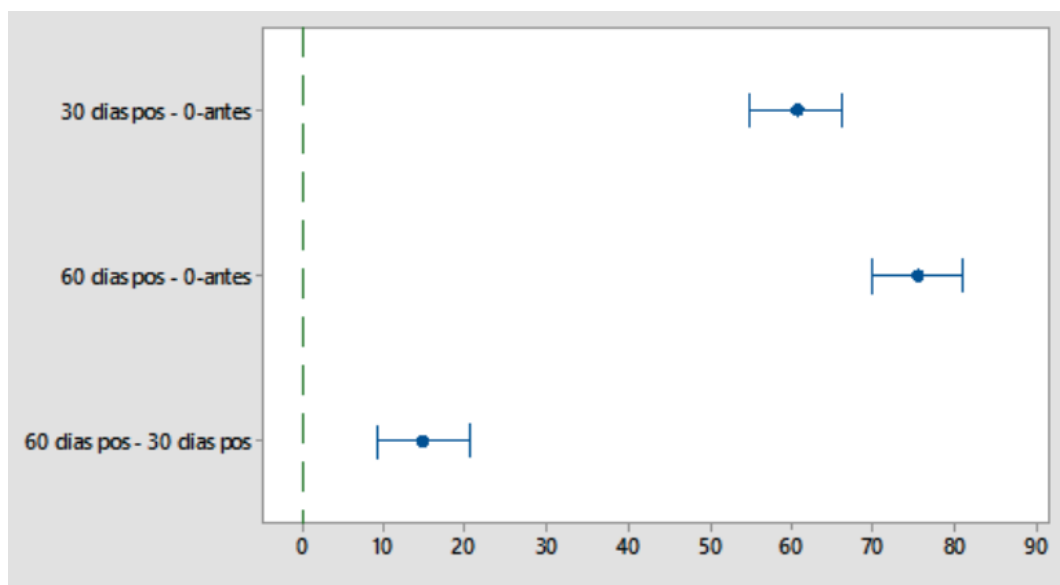
No início do estudo, todos os indivíduos apresentavam mais de 90% de bactérias indesejáveis, interagindo com a mesma dieta, sendo esta adequadamente formulada para a melhoria das condições intestinais, rica em fibras, como descreve a tabela 10. Como esperado, o TMF antecipou a melhora com a nova dieta e, de certa forma, levou os pacientes, no curto espaço de tempo (120 dias), para uma condição semelhante para a microbiota, o que pode ser constatado pelos resultados do sequenciamento 16S RNA.

Tabela 10: Valores nutricionais da dieta dos pacientes do grupo Gastro

Níveis nutricionais da dieta	Valores em 1000g
Energia metabolizável	1.400 kcal
Proteína bruta	80g
Extrato etéreo	50g
Fibra bruta	28g
Matéria seca	300g
Extrato não nitrogenado	150g
Relação cálcio/fósforo	1,33g
Ferro	15mg
Sódio	5g
Cálcio	2mg
Fósforo	1.5mg
Matéria mineral total	10g
Umidade	700g

Fonte: Do autor (2024).

4.11.1 Sobre bactérias desejáveis do Grupo Gastro

Figura 41: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *bactérias desejáveis* dos pacientes

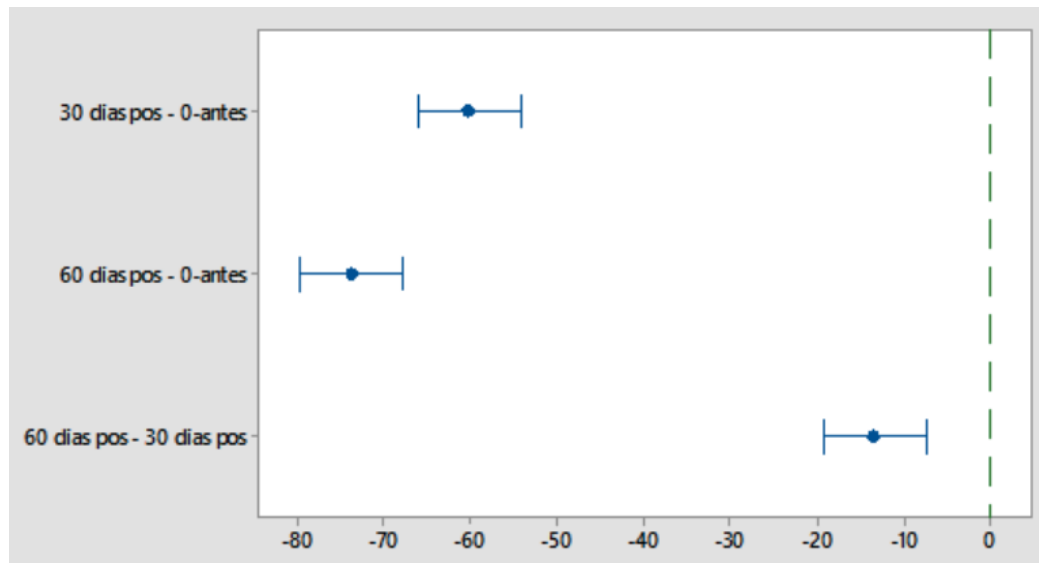
Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 41, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{Antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média

60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

4.11.2 Sobre *bactérias indesejáveis do grupo gastro*

Figura 42: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *bactérias indesejáveis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 42, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

4.12 GRUPO DERMATO

Assim como no grupo gastro, o grupo dermatológico também apresentou mudanças significativas na microbiota, quando comparado a amostras antes, pós-transplante, com 30 e 60 dias.

Tabela 11: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias dos pacientes Dermato

Bactéria	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil 3	Máximo
<i>Clostridium hiranonis</i>	0-antes	1,245	1,016	0	1,913	3,300
	30 dias pós	24,23	6,04	12,00	28,80	31,30
	60 dias pós	28,37	6,61	12,00	32,64	35,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0-antes	13,57	12,50	1,10	24,07	33,12
	30 dias pós	3,543	2,445	0,0	5,450	7,700
	60 dias pós	2,145	1,343	0,0	3,238	4,100
<i>Blautia hansenii</i>	0-antes	2,508	1,683	0,700	3,335	6,200
	30 dias pós	15,20	4,53	8,12	19,52	21,20
	60 dias pós	21,63	7,89	5,00	28,53	28,90
<i>Faecalimonas umbilicata</i>	0-antes	11,85	5,17	5,70	15,92	21,00
	30 dias pós	9,01	3,95	1,05	12,10	15,30
	60 dias pós	4,56	3,94	0,00	7,83	12,12
<i>Clostridium disporicum</i>	0-antes	8,95	5,01	1,90	12,77	16,66
	30 dias pós	7,52	3,82	1,00	10,07	12,75
	60 dias pós	3,508	3,063	0,500	4,758	10,840
<i>Enterococcus faecalis</i>	0-antes	4,22	1,859	2,00	5,527	7,80
	30 dias pós	3,638	1,389	1,90	4,468	6,45
	60 dias pós	2,699	1,856	0,00	3,638	6,45
<i>Escherichia coli</i>	0-antes	17,09	6,35	4,45	22,27	25,00
	30 dias pós	9,38	6,40	2,40	14,25	21,00
	60 dias pós	2,688	2,351	0,70	3,708	8,18
<i>Blautia glucerasea</i>	0-antes	1,681	1,620	0,00	3,050	4,620
	30 dias pós	3,845	2,710	0,970	6,732	7,70
	60 dias pós	17,40	10,10	7,70	22,05	40,00
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0-antes	6,92	6,81	0,33	8,10	24,22
	30 dias pós	4,543	1,938	2,20	6,35	8,00
	60 dias pós	4,320	3,041	0,00	5,668	10,00
<i>Terrisporobacter mayombe</i>	0-antes	7,03	5,17	0,80	8,55	19,70
	30 dias pós	4,143	2,888	0,520	6,125	10,20
	60 dias pós	2,620	2,659	0,40	3,228	9,50
<i>Streptococcus lutetiensi</i>	0-antes	8,28	10,67	1,20	6,91	38,17
	30 dias pós	4,357	2,369	1,20	6,112	8,30
	60 dias pós	2,202	1,767	0,00	3,725	5,40
<i>Staphylococcus felis</i>	0-antes	4,514	1,328	2,10	5,25	7,00
	30 dias pós	3,521	2,221	0,00	4,81	7,00
	60 dias pós	2,506	1,567	0,22	3,655	5,08
<i>Enterobacter cancerogenu</i>	0-antes	5,18	5,29	0,0	7,96	17,90
	30 dias pós	2,673	1,367	0,0	4,027	4,45
	60 dias pós	2,246	2,890	0,0	2,907	9,90

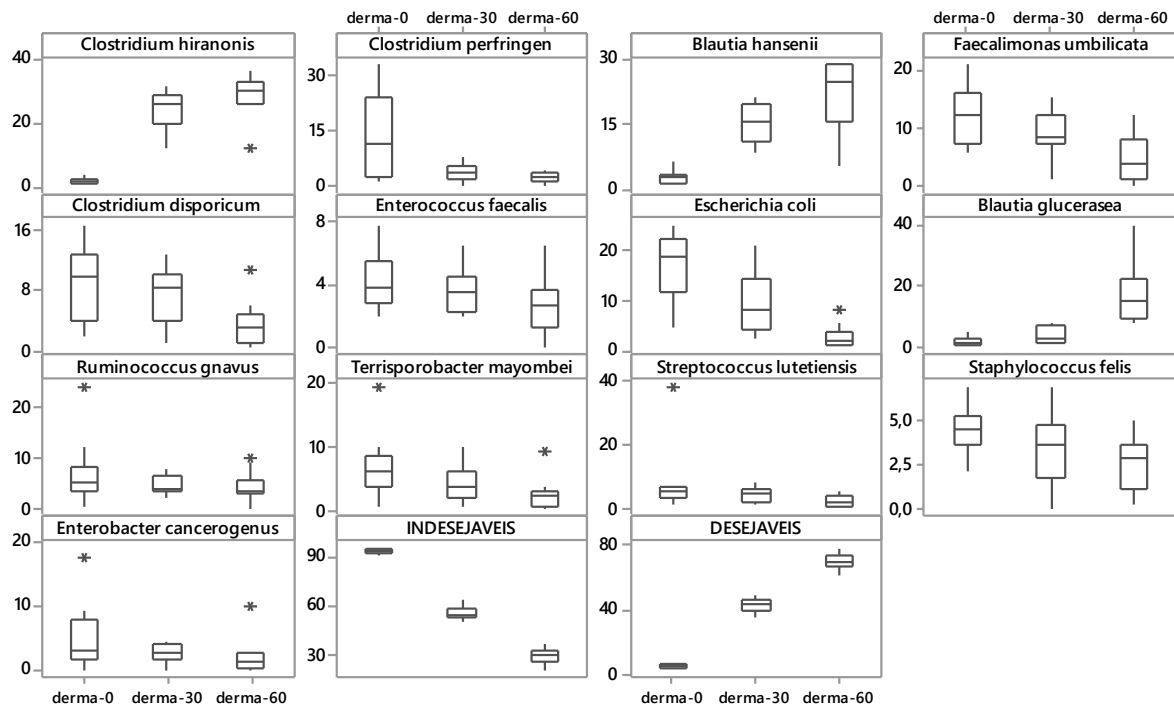
Fonte: Do autor (2024).

Tabela 12: Estatísticas descritivas para o grupo de bactérias desejáveis e indesejáveis para os pacientes dermato

Bactéria	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Maximo
DESEJAVEIS	0-antes	5,323	1,38	3,76	6,805	7,13
	30 dias pós	43,41	4,29	35,50	46,88	49,50
	60 dias pós	70,71	4,77	62,39	74,05	78,98
INDESEJAVEIS	0-antes	93,721	1,753	90,90	95,225	96,00
	30 dias pós	55,83	4,05	50,50	58,38	64,50
	60 dias pós	29,29	4,77	21,02	32,31	37,61

Fonte: Do autor (2024).

Figura 43: Gráficos Box Plots – Pacientes dermato: as espécies de bactérias desejáveis: Clostridium hiranonis, Blautia hansenii, Blautia gluceracea, estiveram presentes em maiores e crescentes proporções nas amostras analisadas pós 60 dias do transplante realizado no grupo dos doentes dermato

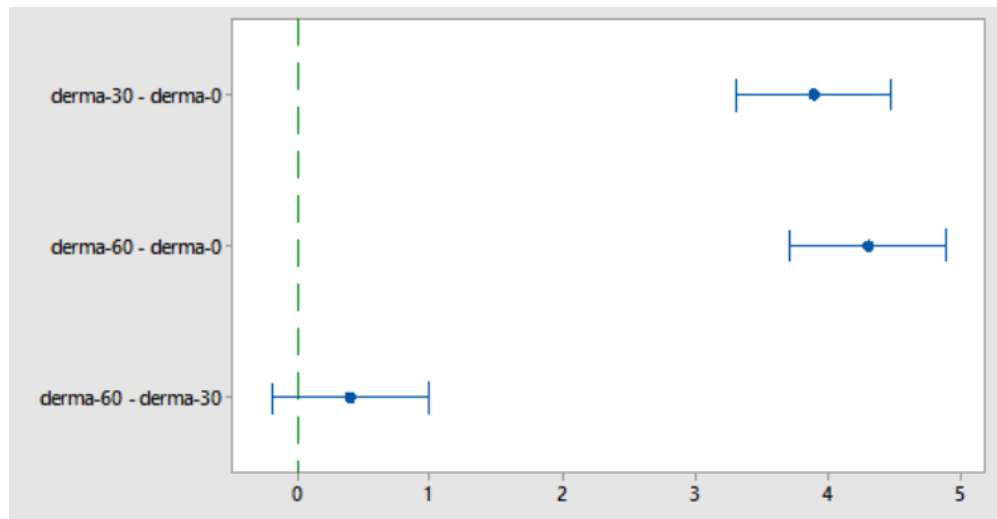


Fonte: Do autor (2024).

Tabela 13: Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias de bactérias antes, 30 e 60 dias após o TMF - Nível de significância ($\alpha = 0,05$) – pacientes dermato

Bactéria	Transformação de variável	F-value	p-value	Resultado
<i>Clostridium hiranonis</i>	Raiz quadrada	137,51	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de dermato (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Clostridium perfringens</i>	Raiz quadrada	6,48	0,005	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Blautia hansenii</i>	Raiz quadrada	47,19	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Faecalimonas umbilicata</i>		6,98	0,004	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Clostridium disporicum</i>		4,86	0,016	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Enterococcus faecalis</i>		2,00	0,155	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Escherichia coli</i>		17,96	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Blautia glucerasea</i>	Raiz quadrada	30,03	0,000	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Ruminococcus gnavus</i>		1,05	0,365	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Terrisporobacter mayombeii</i>		3,57	0,042	Há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Raiz quadrada	2,33	0,117	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p < 0,05
<i>Staphylococcus felis</i>		3,30	0,052	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05
<i>Enterobacter cancerogenus</i>		1,97	1,159	Não há diferença entre medias para os 3 níveis de fatores de gastro (antes, 30 e 60) valor-p > 0,05

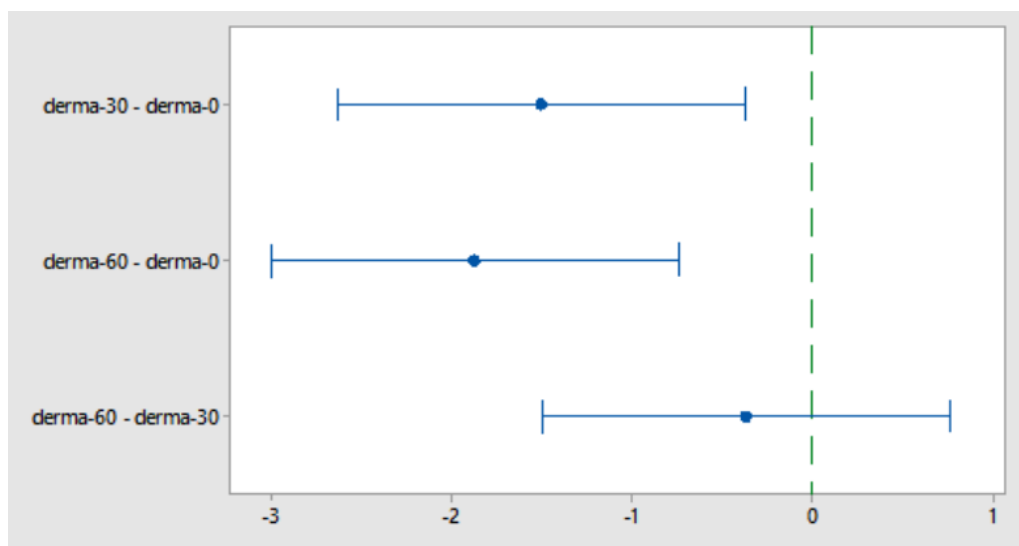
Figura 44: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Clostridium hiranonis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 44, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

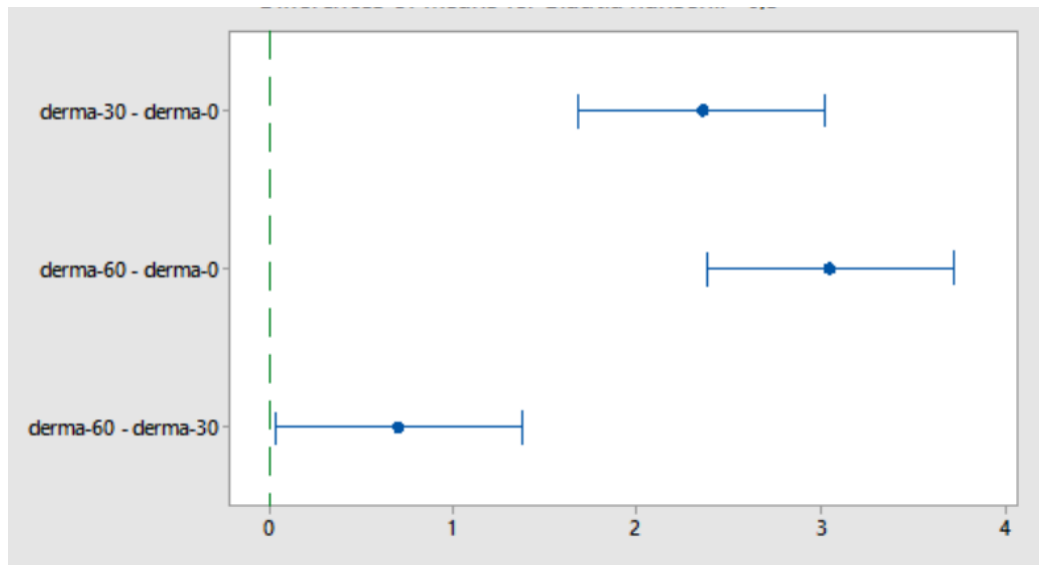
Figura 45: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Clostridium perfringen* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 45, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

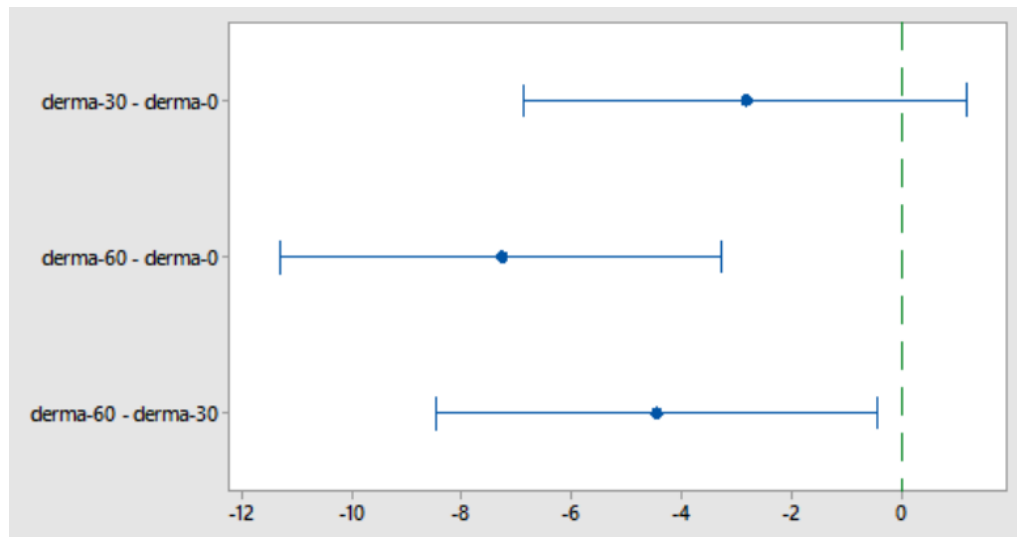
Figura 46: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Blautia hansenii* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 46, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

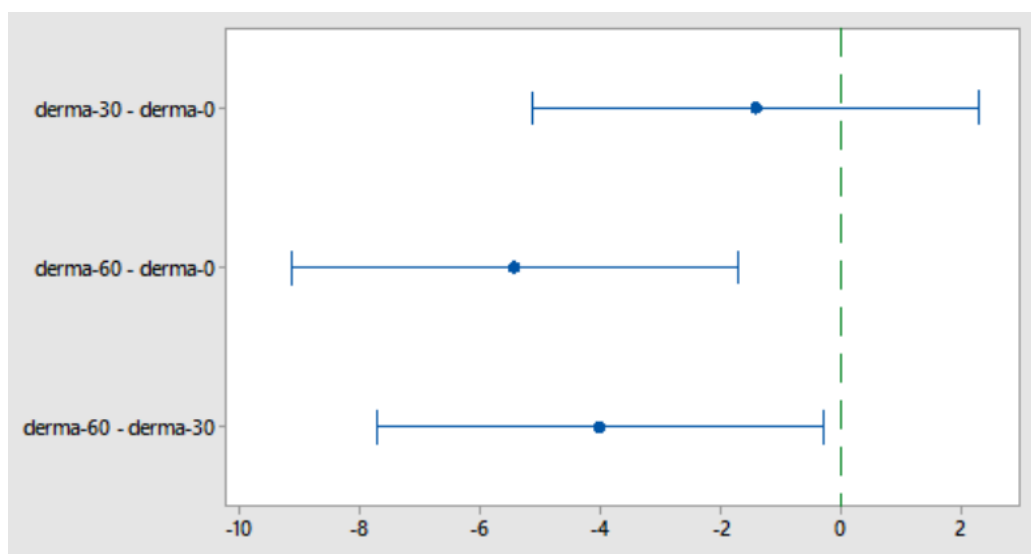
Figura 47: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Faecalimonas umbilicata* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 47, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

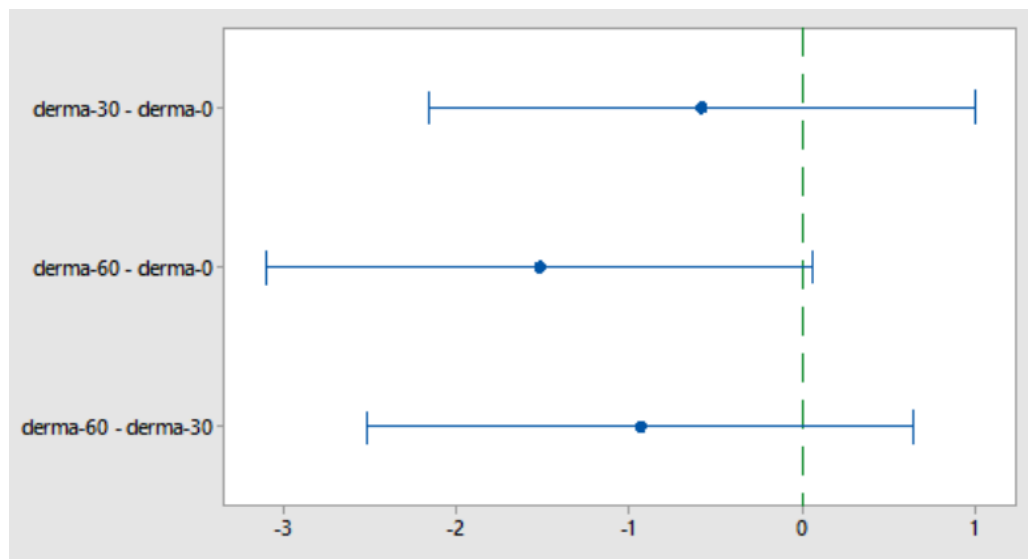
Figura 48: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Clostridium disporicum* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 48, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

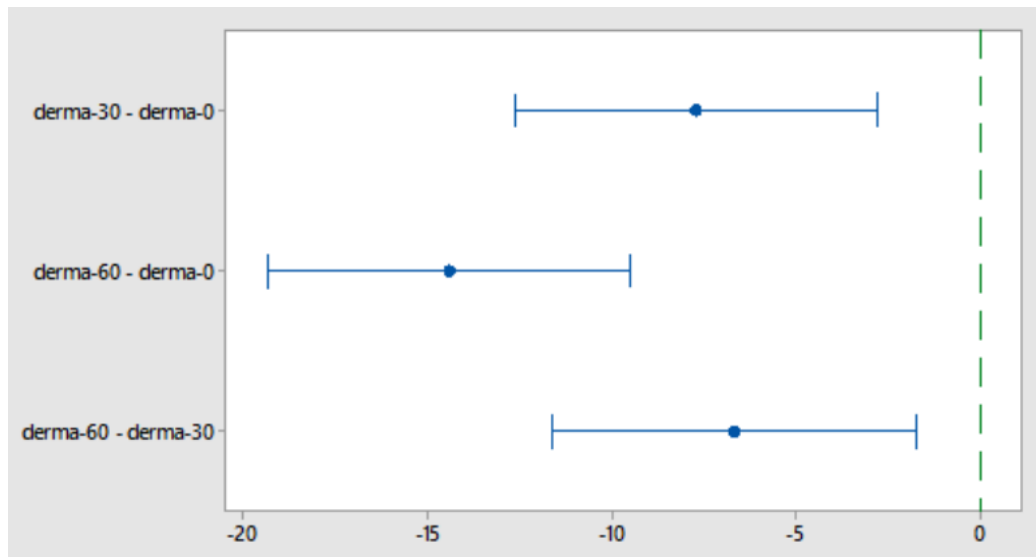
Figura 49: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Enterococcus faecalis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 49, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Com um intervalo de confiança 90% teríamos diferença significativa. Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

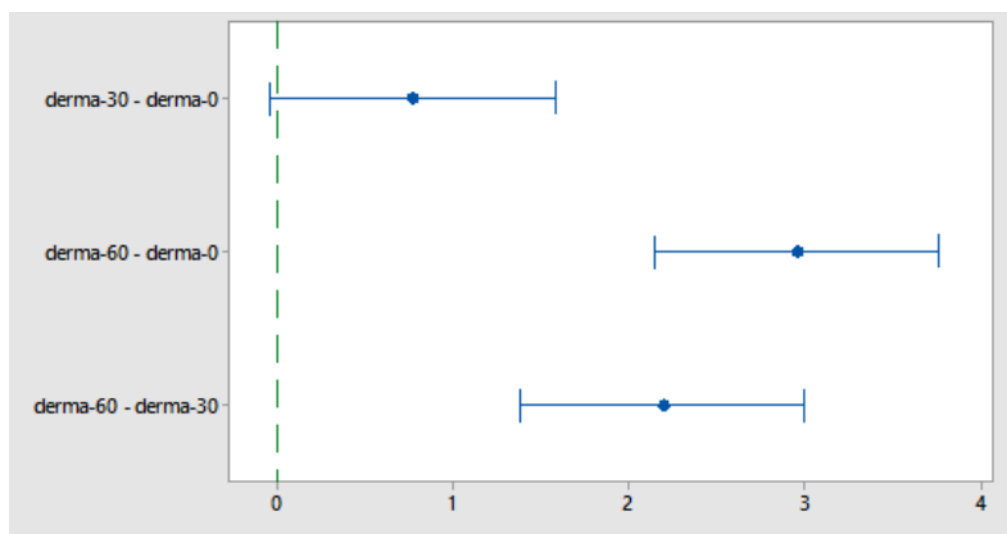
Figura 50: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Escherichia coli* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 50, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

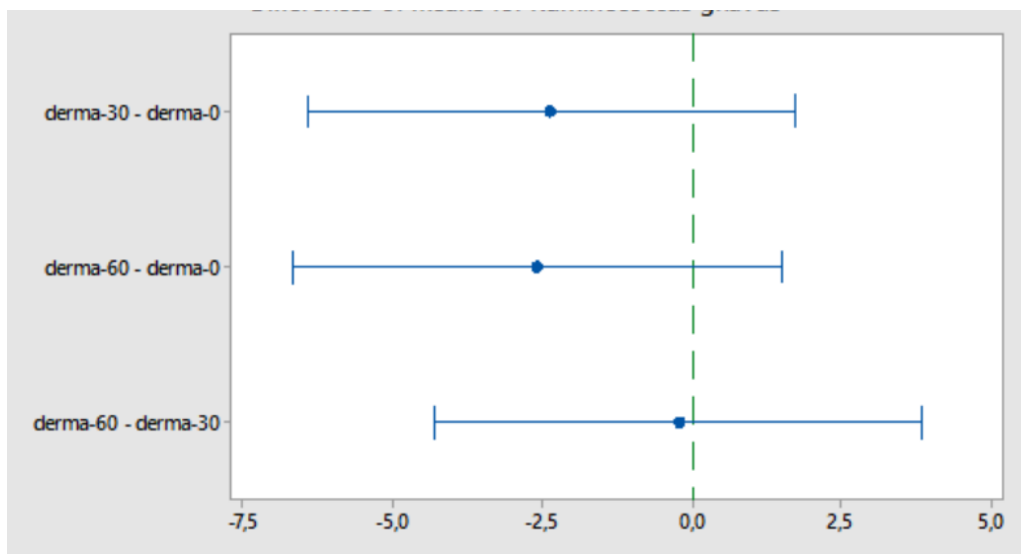
Figura 51: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Blautia glucerasea* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 51, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Com 90% de confiança teríamos diferença significativa. Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ não contém o valor zero).

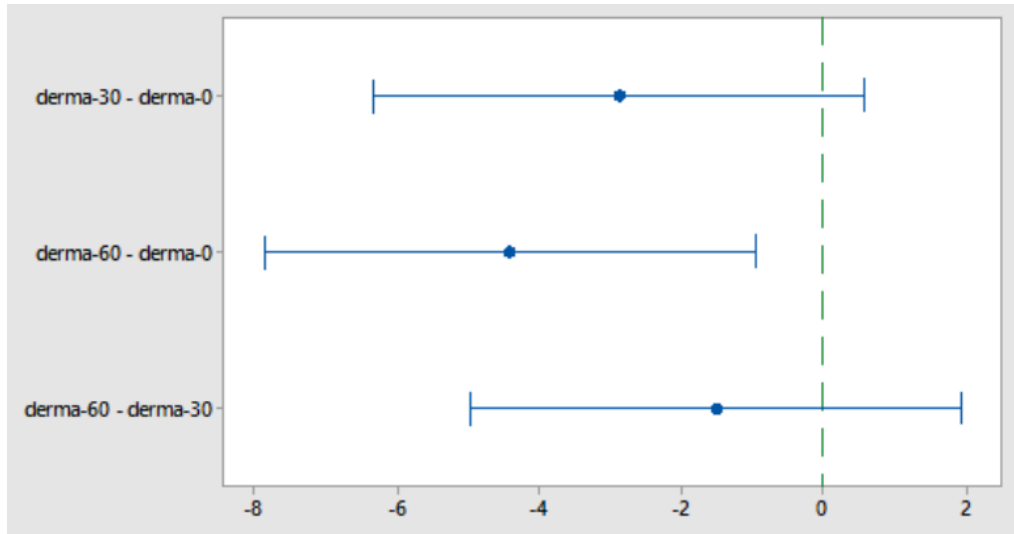
Figura 52: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *bactérias Ruminococcus gnavus* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 52, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

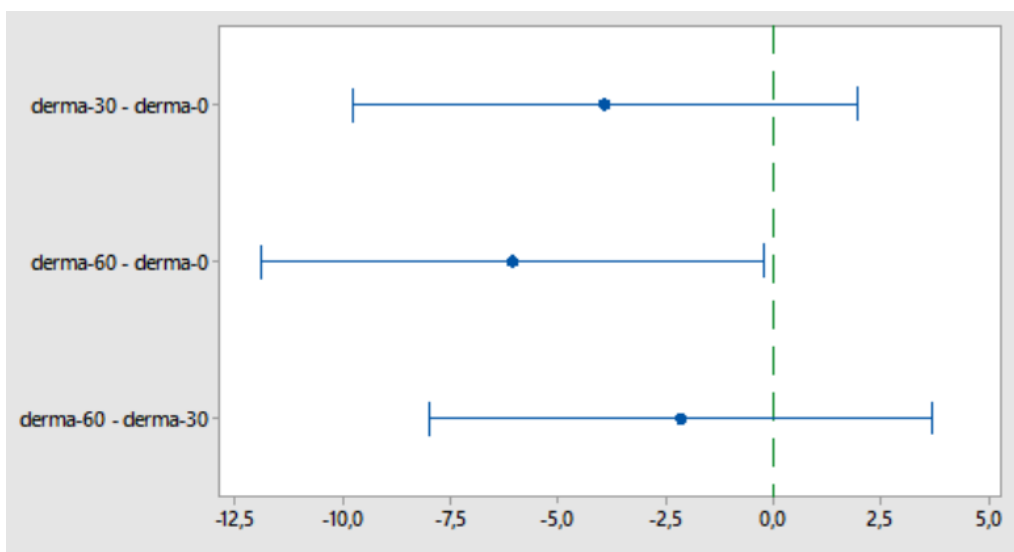
Figura 53: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Terrisporobacter mayombei* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 53, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

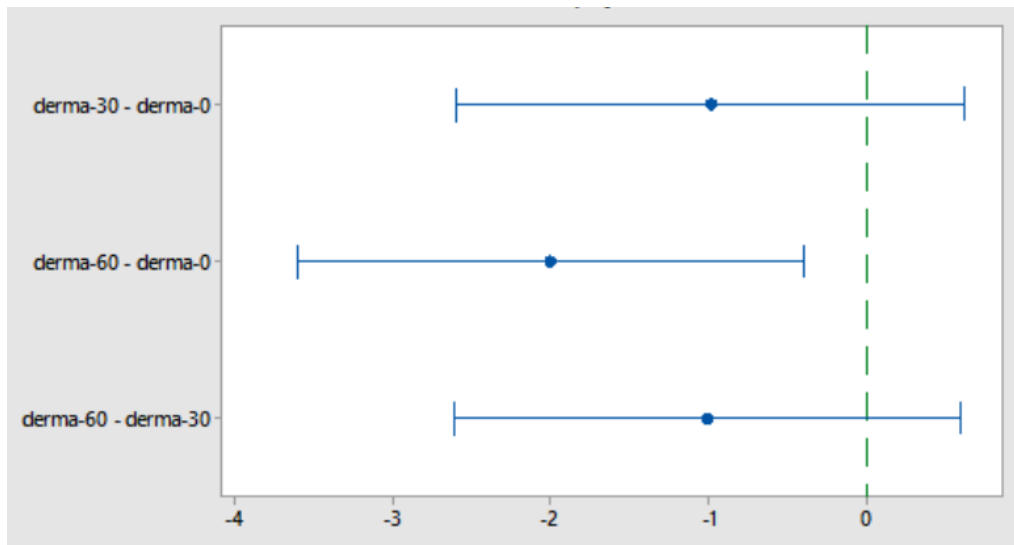
Figura 54: Comparação de Fisher 95% entre as médias de bactérias *Streptococcus lutetiensis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 54, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a médias Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

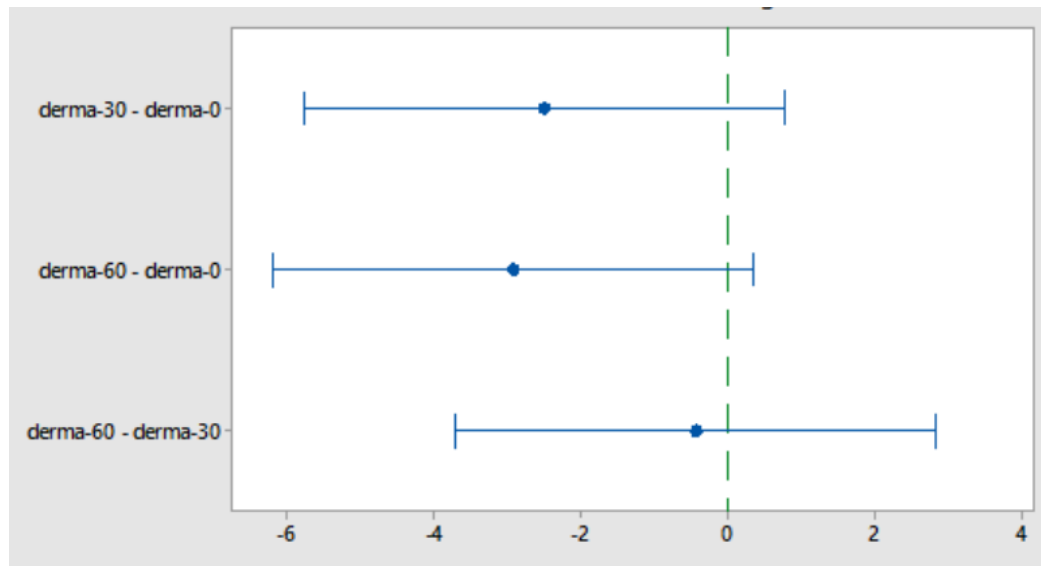
Figura 55: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *bactérias Staphylococcus felis* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 55, verificou-se diferenças não significativas entre a média 30 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média Antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ não contém o valor zero). Diferenças não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

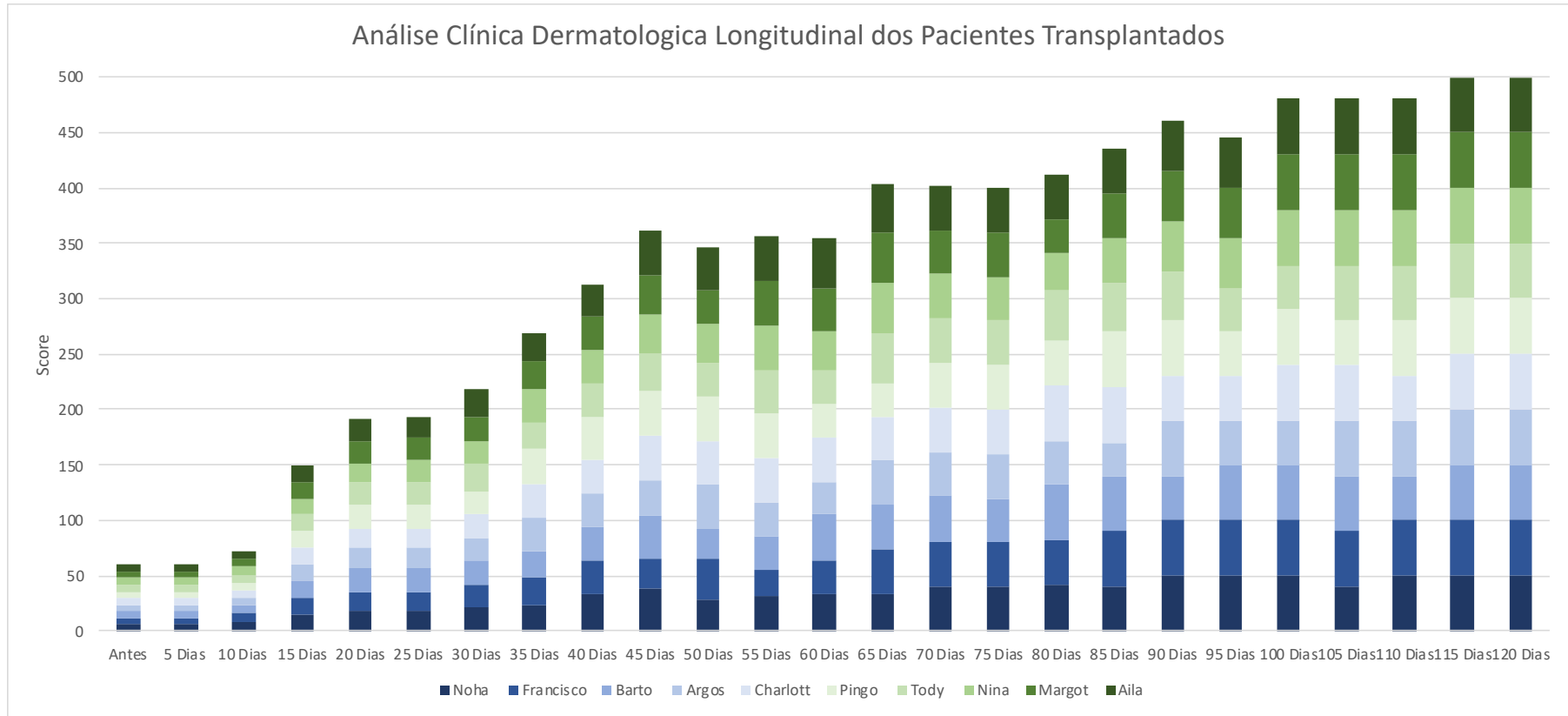
Figura 56: Comparação de Fisher 95% entre as médias de *bactérias Enterobacter cancerogenus* dos pacientes



Fonte: Do autor (2024).

Como é descrito na figura 56, o teste de comparação de Fisher mostrou diferenças não significativas entre média de *bactérias Enterobacter cancerogenus* 30 dias após o TMF e média de *bactérias Enterobacter cancerogenus* antes do TMF (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre média 60 dias e média antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$ contém o valor zero). Diferenças não significativas entre média 60 dias e média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$ contém o valor zero).

Figura 57: Resultados clínicos longitudinais de pacientes dermato



Fonte: Do autor (2024).

Assim como nos pacientes gastro, é possível observar a evolução clínica dos pacientes dermato no transcorrer de 120 dias de observação. Conforme *score* de manifestação computado a cada 05 dias (soma dos pontos), o grupo formado por 10 pacientes somou, aos 120 dias, a pontuação máxima de 500 pontos, ou seja, todos os indivíduos nos últimos 5 dias não apresentaram prurido. Comparando-se as manifestações clínicas antes e após o tratamento, no transcorrer dos 120 dias de observação, o grupo apresentou melhora das manifestações clínicas pós-transplantes (Figura 57).

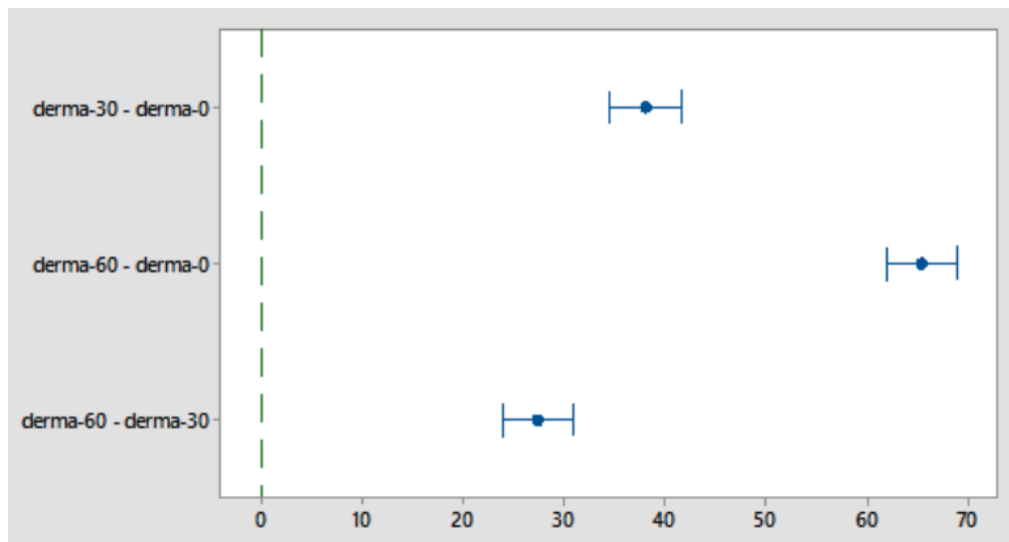
A dieta dos pacientes manteve-se inalterada quando comparada aos períodos antes e após o transplante. Cada paciente tratado manteve sua dieta original, sem alteração, antes e após o tratamento, sendo composta por alimentação natural ajustada e formulada por nutrólogo veterinário, por meio do *Software* Supercraque 3.0. Os animais consumiam esta dieta desde 30 dias anteriores ao início do tratamento com TMF. Apenas um paciente consumia ração hipoalergênica, e manteve-se com a dieta.

Os animais medicados com apoquel (3 animais), e corticoides (2 animais), mantiveram o uso durante o tratamento, as fichas de dados foram coletadas a cada 30 dias de observação. Durante a coleta de dados, os tutores mantiveram contato semanal com o pesquisador responsável, informando sobre a situação dos animais. Nenhum relato de hiporexia, êmese e prostração foi observado durante o período. A melhora das condições clínicas no grupo Dermato foi mais lenta em relação ao grupo Gastro, porém, apresentou menor oscilação durante o período.

É variável o tempo para obtenção de maior estabilidade da nova microbiota, e da relação microbiota/pele. As respostas foram individuais para cada paciente, mesmo estando em condições clínicas semelhantes. Antes da realização dos transplantes todos os indivíduos apresentavam mais de 90% de bactérias indesejáveis, e menos de 10% de bactérias desejáveis.

4.12.1 Sobre bactérias desejáveis grupo dermató

Figura 58: Gráfico bactérias desejáveis no grupo dermató, mostrando diferenças significativas na comparação antes, e 30 e 60 dias após

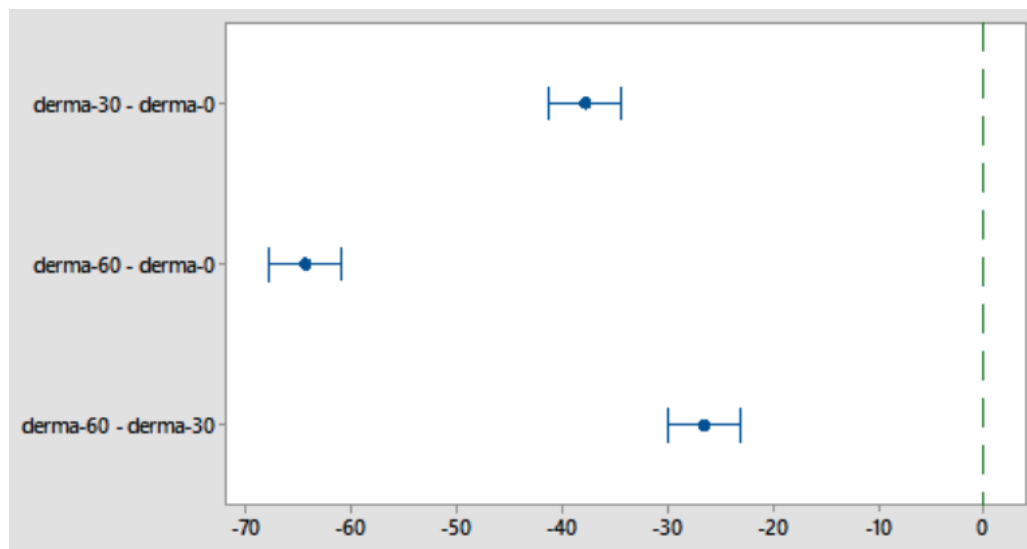


Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 58, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias e a média antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$, não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média antes (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$, não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$, não contém o valor zero).

4.12.2 Sobre bactérias indesejáveis no grupo Dermato

Figura 59: Gráfico bactérias indesejáveis no grupo dermato, mostrando diferenças significativas na comparação antes, e 30 e 60 dias após



Fonte: Do autor (2024).

O resultado da comparação de Fisher, figura 59, verificou-se diferenças significativas entre a média 30 dias do TMF e a média antes do TMF (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$, não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média antes do TMF (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$, não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$, não contém o valor zero).

Destaque também no grupo dermato, o aumento das bactérias *Clostridium Hiranonis* e *Blaudia*, pós-transplante, sendo essas encontradas e esperadas no microbioma de animas não atópicos, pois são importantes moduladores de inflamações. Essas tinham baixa expressão antes dos transplantes nestes pacientes.

Houve diferenças significativas entre a média 30 dias e a média antes do TMF (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{30} - \mu_{\text{antes}}$, não contém o valor zero). Diferenças significativas entre a média 60 dias e a média antes do TMF (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{\text{antes}}$, não contém o valor zero). Diferenças estatisticamente não significativas entre a média 60 dias e a média 30 dias (intervalo de confiança 95% para a diferença $\mu_{60} - \mu_{30}$, contém o valor zero).

4.13 SÍNTESE DOS RESULTADOS

4.13.1 Análise do *Clostridium hiranonis* pós-transplante

A *Clostridium hiranonis* é uma bactéria comensal e de importante interferência na saúde intestinal, pois atua fortemente na ativação de ácidos biliares, na regulação do peristaltismo, tem ação modulada de citocinas inflamatórias, atua na produção de ácidos graxos de cadeia curta (SFAs) como butirato, por meio da fermentação das fibras, modulando a secreção de mucina. São moduladoras de alergias e antígenos, também modulam inflamações. Assim, espera-se maior população dessa bactéria no intestino de animais saudáveis e menor em animais com inflamações crônicas (Bottero *et al.*, 2017).

Como observado, foi encontrada boa participação da *Clostridium hiranonis* nas amostras dos animais doadores, e baixa participação nos animais receptores, dos dois grupos, gastro e dermato. Após o transplante, constatou-se aumento significativo da população dessa bactéria após 30 e 60 dias, mantendo-se estável, não apresentando diferença significativa quando comparado 30 e 60 dias pós-transplante.

4.13.2 Resumo das evidências

O quadro 13 apresenta uma descrição das evidências alcançadas pela pesquisa, seguindo os procedimentos metodológicos para caracterização das fezes dos doadores desde a umidade ideal no momento da coleta, o processo de armazenamento, a especificação da viscosidade ideal do enema, temperatura para a realização do transplante fecal, que comprovam os objetivos específicos do trabalho.

Quadro 13: Resumo dos objetivos específicos e as evidências

Objetivos específicos	Evidências
A caracterização dos doadores e sua microbiota, para definição do perfil de microbiota saudável, com o sequenciamento da biota do doador ideal.	Foram selecionados 06 doadores de mesma raça, com alto grau de parentesco, criados em mesmo ambiente, com dieta alimentar conhecida, descrita na seção 4.7, cujo perfil da microbiota por análise de sequenciamento do gene rRNA 16S Nanoporo, constatou em todos os animais, mais de 90% de bactérias desejáveis. Esses animais passaram por avaliação clínica e exames complementares (quadro 3 e 4), sendo aprovados como doadores pelos resultados obtidos descrito pelas características das fezes (quadro 9 e 10).
Definição do processo de armazenamento, conservação e preparo da solução dos enemas.	As fezes frescas passaram por avaliação prévia de umidade, com definição de padrão para 70%. O material foi armazenado em freezer -80 °C após apenas a adição de 10% de glicerol. Os enemas foram acondicionados em falcon de 50mL, cujo padrão do preparo foi de 70g para este volume. Em média, para os TMF, os animais receberam entre 4 a 7 mL por kg de peso vivo. A diluição considerou de 3 a 5g de fezes frescas por kg de peso vivo do animal tratado.
Definição do procedimento de transplante da microbiota fecal.	Todo o processo para o TMF foi detalhadamente descrito (seção 4.10). Os animais transplantados ficaram em jejum prévio de 12 horas antes da manobra, foram estimulados via breve caminhada para defecarem na noite anterior, e pela manhã, antes da realização do transplante. Foram utilizadas sondas retais número 22, de uso humano. Os procedimentos foram realizados no hospital VFP – Araraquara-SP. A sonda foi introduzida no reto com o animal em estação e não sedado. Foi introduzida até a altura das cristas ilíacas (medida entre o ânus e a referida região lombar). O procedimento foi repetido em 3 vezes, como intervalo de 10 dias.
O procedimento de coleta das fezes dos doadores eleitos.	As coletas foram realizadas pós-aprovação dos doadores. Sempre em dias e horários alternados, pós-avaliação da umidade e aspecto das fezes, conforme escala adaptada de Bristol. A soma de 04 coletas de um mesmo doador foram misturadas, pesadas e adicionada solução de glicerol à 10%. Posterior foram armazenadas em falcon de 50 mL.
Elaboração do painel da microbiota dos doadores	O painel da microbiota dos cães aptos a serem doadores para o TMF é um conjunto de informações, que foram apresentados nos quadros 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 10.
Avaliação dos critérios de qualidade do enema armazenado	A qualidade do enema armazenado está associada à manutenção das bactérias, descrita no quadro 8.
Avaliação e estudo dos requisitos de registro do biobanco	A constituição de um biobanco de fezes caninas requer o estabelecimento de critérios seguros, que dependem de iniciativas de regulamentação pelos órgãos governamentais. Na seção 2.4, estes critérios foram apresentados.

Fonte: Do autor (2025).

5 CONCLUSÃO

O TMF em cães, embora não seja uma terapia nova (Barbugli Filho; Gorni; Amaral, 2024), vem sendo realizada isoladamente por pesquisadores e enfrenta limitações, devido tanto ao desconhecimento da terapia quanto a ausência de biobancos de fezes caninas, que atualmente restringem sua aplicação por depender exclusivamente de fezes frescas. Este estudo contribui para que a terapia de TMF se torne escalável ao propor um conjunto de critérios e protocolos para o armazenamento e uso de fezes caninas, viabilizando a aplicação segura do TMF como terapia em medicina veterinária. Estes resultados configuram a relevância do trabalho, como o primeiro estudo a definir critérios e protocolos para a criação de um biobanco de fezes caninas no Brasil, estabelecendo um marco para a área.

O sucesso do TMF em cães depende criticamente da qualidade microbiológica e do rigor metodológico aplicado à seleção e ao manejo dos animais doadores. Os enemas utilizados no estudo apresentaram mais de 90% de táxons bacterianos associados às funções simbióticas essenciais, como modulação imunológica, integridade da barreira intestinal, produção de metabólitos bioativos e manutenção da homeostase gastrointestinal, evidenciando seu papel central na fisiologia e na saúde intestinal dos animais receptores.

A seleção dos doadores foi decisiva e mostrou-se superior ao simples diagnóstico quantitativo de eubiose. A caracterização da microbiota foi realizada por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando tecnologia de nanoporos, a qual se mostrou altamente sensível, reprodutível e adequada para análises taxonômicas em tempo real, permitindo maior profundidade e confiabilidade na identificação dos perfis bacterianos. Além disso, todo o processo foi sustentado por um protocolo rigoroso de seleção, controle sanitário e monitoramento contínuo dos animais doadores durante o período de coleta, incluindo avaliação clínica e acompanhamento nutricional.

Assim, o processo de seleção dos doadores constitui diferencial metodológico que supera o exame isolado de eubiose quantitativa. Os fatores determinantes de destaque incluem histórico clínico, idade entre 3-6 anos, manejo alimentar e monitoramento contínuo, independentemente de raça ou sexo. É válido priorizar animais com exposição ambiental natural, parto vaginal assistido e histórico e ou pedigree de progenitores longevos, como foram os doadores selecionados.

Desta forma, este trabalho pode ser compreendido como a criação de um modelo de biobanco de fezes caninas. Esse modelo elimina a conduta de práticas empíricas, realizadas nos procedimentos de TMF, que podem comprometer os resultados, além da segurança dos pacientes.

O trabalho desenvolvido reforça a relevância dos procedimentos metodológicos adotados, que garantiram especialmente a segurança dos receptores e permitiram verificar a eficácia do procedimento. O conjunto de procedimentos foi eficiente para o sucesso do TMF, não ocasionando refluxos ou quaisquer efeitos adversos após o transplante do enema. Foram elaborados protocolos/procedimentos para o preparo do enema, conservação, diluição, viscosidade ideal, consistência e posologia. O TMF a partir do enema armazenado resultou nos animais transplantados a reprodução e manutenção das características da microbiota dos doadores.

A pesquisa demonstrou que o TMF é uma terapia promissora para o tratamento de enteropatias e dermatites atópicas idiopáticas em cães, com eficácia associada à revitalização da microbiota intestinal. A partir de diagnósticos clínicos precisos (embasado em exames clínicos), relatos detalhados dos responsáveis pelos animais e análises microbiológicas comparativa da microbiota antes e depois do transplante fecal nos receptores, constatou-se a restauração da eubiose e a melhora clínica dos animais tratados durante o acompanhamento.

Este estudo abre uma nova linha de pesquisa em medicina veterinária no Brasil, com potencial empreendedor, ao oferecer um modelo escalável e padronizado que pode ser adotado por clínicas, centros de pesquisa e empresas do setor veterinário, estimulando inovações e parcerias público-privadas para a produção e distribuição de material biológico. Também se verificou a importância da nutrição para a manutenção e preservação de uma microbiota saudável. Este relacionamento pode ser aprofundado com pesquisas específicas focadas na nutrição.

Como pesquisas futuras, recomenda-se estudos longitudinais mais longos, além do período avaliado neste trabalho, para comprovar a manutenção dos efeitos do TMF e o aprimoramento (novas tecnologias) nos exames e testes para a avaliação da microbiota do doador, refinando os conhecimentos sobre as bactérias que agem na melhoria da saúde. Também deve-se destacar algumas limitações do estudo, como o tamanho da amostra (20 receptores e 6 doadores), suficientes para o trabalho, mas pode ser ampliado para validação em diferentes contextos clínicos.

REFERÊNCIAS

ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. *O mercado pet brasileiro, movimentou em 2022, mais de 40 bilhões de reais*. Disponível em: <https://abinpet.org.br/informacoes-gerais-do-setor/>. Acesso em: 9 out. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos*, RDC nº 23 (27 maio, 2011). [citado 2011 set 26] Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20954&word=>

AKAMINE, C. K. M. *et al.* 2023. Alimentação natural na dieta dos cães. *Pubvet*. v. 17, n. 12, nov. 2023, p. e1496. Doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n12e1496>.

ALONSO, M. A. *et al.* Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras y bancos de materiales humanos con fines de investigación biomédica. *Revista Española de Salud Pública*. 2007, v. 81, n. 2, p. 95-111.

ALSHAWAQFEH, M. K. *et al.* A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecologia* 1, v. 93, n. 11, 2017.

ALVES, J. C.; JORGE, P.; SANTOS, A. A survey on the prevalence of diarrhea in a Portuguese population of police working dogs. *BMC Vet Res*. 2021, jun., n. 7; v. 17, p. 1. Doi: 10.1186/s12917-021-02920-y. PMID: 34098935; PMCID: PMC8186175.

ANDEPUTTE, D. *et al.* Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*, 2016, jan., n. 65, v. 1, p. 57-62. Doi: 10.1136/gutjnl-2015-309618. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26069274; PMCID: PMC4717365.

ANDERSON, W. Natural histories of infectious disease: ecological vision in twentieth-century biomedical sciences. *Osiris*, v.19, p. 39-61. 2004.

BALOUËI, F. *et al.* Factors Affecting Gut Microbiota of Puppies from Birth to Weaning. *Animals (Basel)*, 2023, feb. 6; n. 13, v. 4, p. 578. Doi: 10.3390/ani13040578. PMID: 36830365; PMCID: PMC9951692.

BARBUGLI FILHO, A. R.; AMARAL, C. S. T; TROVATTI, E. Tendências biotecnológicas para o mercado pet de cães. *Revista Sociedade Científica*, v. 7, n. 1, p. 1904-1919, 2024

BARBUGLI FILHO, A. R.; AMARAL, C. S. T. A terapia regenerativa da microbiota intestinal: acompanhamento longitudinal de transplante de microbiota fecal em filhotes de cães. *Revista Sociedade Científica*. v. 7, n. 1, nov. 2024, p. 5629-5646. DOI:<https://doi.org/10.61411/rsc202483917>.

BARBUGLI FILHO, A. R.; GORNI, G.; AMARAL, C. S. T. 2024. Transplante fecal em cães: revisão bibliográfica dos últimos dez anos. *REVISTA DELOS*. 17, 59 (set. 2024), e1962. Doi: <https://doi.org/10.55905/rdelosv17.n59-025>.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. *Uma Introdução à Reologia*. Rio de Janeiro – RJ/São Paulo – SP: Elsevier Science. 1989.

BARTGES, J. W. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 42, n. 4, p. 669-692. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.04.008, 2012.

BAUNWALL, S. M. *et al.* Faecal microbiota transplantation: Establishment of a clinical application framework. ***European Journal of Gastroenterology & Hepatology***. 2017, v. 29, n. 1. Doi: 10.1097/MEG.0000000000000958.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. ***Food Res. Int.***, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. *Fenômenos de transporte*. 2. ed., 2007.

BLAKE, A.; SUCHODOLSKI, J. S. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. ***Animal Frontiers***, v. 6, n. 3, p. 37-42, 2016.

BEALE, K. M.; LAFLAMME, D. P. Comparison of a hydrolyzed soy protein diet containing corn starch with a positive and negative control diet in corn- or soy-sensitive dogs. ***Veterinary Dermatology***, v. 12, n. 237, 2001. [s.p.].

BETHLEHEM, S.; BEXLEY, J.; MUELLER, R. S. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, v. 145, p. 582-589, 2012.

BORDIN, A. I. *et al.* Effects of administration of live or inactivated virulent *Rhodococcus equi* and age on the fecal microbiome of neonatal foals. ***Plos One***, jun. 2013.

BOTTERO, E.; BENVENUTI, E.; RUGGIERO, P. Fecal Microbiota Transplantation (FMT) in 16 Dogs with Idiopathic IBD. ***Veterinaria***, 2017, n. 31, p. 31-45.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. *Regulamentação do armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa*, Res CNS nº 347 (13 jan, 2005). [citado 2010 jun 26] Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/docs/Reso347.doc>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos*, RDC nº 23 (27 mai, 2011). [citado 2011 set 26] Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0023_27_05_2011_rep.html.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.201, de 14 de setembro de 2011. Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa. *Diário Oficial*, Brasília, DF. 2011 Sep 15; n. 1, p. 40-42.
- CAMMAROTA, G. *et al.* *Gut*, 2019, n. 68, p. 2111-2121.
- CARCIOFI, A. C. *et al.* A weight loss protocol and owners participation in the treatment of canine obesity. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1331-1338, 2005.
- CARREIRO, I.; MARANDUBA, C. M. Biobancos: uma base para pesquisas de qualidade. *Einstein (São Paulo)*, v. 18, p. eCE5266, dez. 2019. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020CE5266.
- CHAITMAN, J. *et al.* Fecal microbial and metabolic profiles in dogs with acutediarrhea receiving either fecal microbiota transplantation or oral metronidazole. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, n. 16, p. 7-192, 2020.
- CHAITMAN, J.; GASCHEN, F. Fecal microbiota transplantation in dogs. *VetClin North Am Small Anim Pract*, v. 51, p. 219-233, 2021.
- CHEVRAND, C. G. *Biobancos e biorepositórios são tema de encontro no Rio*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2015. Disponível em: < <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/biobancos-e-biorrepositorios-sao-tema-de-encontro-no-rio> >. Acesso em: 12 nov. 2015.
- COSTELLO, S. P. *et al.* Systematic review with meta-analysis: fecal microbiota transplantation for induction of remission of active ulcerative colitis. *AP&T Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, n. 46, p. 213-224. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apt.14173224>. Acesso em: 05 ago. 2024.
- CORDEIRO, J. V. *et al.* THU0622 Patient-centered aging biobanks – a survey on public perceptions and patient choice among rheumatology outpatients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 16, n. 2, p. 441, 2017.
- DANIELLE, G. L. *et al.* Technician-Scored Stool Consistency Spans the Full Range of the Bristol Scale in a Healthy US Population and Differs by Diet and Chronic Stress Load. *The Journal of Nutrition*, 2021, n. 151, v. 6, p. 1443-1452. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316622001924>.
- DHALIWAL, R. *et al.* Senior care guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, n. 59, p. 1-21. 2023. Doi: 10.5326/JAAHA-MS-7343.
- DONOHUE, D. R. *et al.* O microbioma e o butirato regulam o metabolismo energético e a autofagia no cólon de mamíferos. *Cell Metab.*, 2011, n. 13, p. 517-526. Doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.

DOURADO, A. S.; MELO, D. O. Prisma 2020 – checklist para relatar uma revisão sistemática. *Estudantes para Melhores Evidências (EME) Cochrane*. 19 set. 2022. [s.p.]. Disponível em: <https://eme.cochrane.org/prisma-2020-checklist-para-relatar-uma-revisao-sistemica>. Acesso em: 2 out. 2023.

EISEMAN, B. *et al.* Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*, v. 44, p. 854-858. 1958.

FEHILY, S. R. *et al.* Clinical perspectives: the gut microbiota and gut disease. *Internal Medicine Journal*. v. 51, p. 1594-1604, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/imj.15520>. Acesso em: 11 ago. 2024.

FLESCH, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. D. C. The therapeutic use of symbiotics. ABCD. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 206-209, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-67202014000300012>.

FOSTER, M. L. *et al.* Characterization of the fungal microbiome (mycobiome) in fecal samples from dogs. *Veterinary Medicine International*, article ID: 658373, 2013.

GAGNE, J. W.; WAKSHLAG, J. J. Pathophysiology and clinical approach to malnutrition in dogs and cats. In: Chan, D. (Ed.). *Nutritional Management of Hospitalized Small Animals*, Wiley & Sons, 2015.

GARCIA-MAZCORRO, Jose F. *et al.* Abundância e variabilidade temporal de curto prazo da microbiota fecal em cães saudáveis. *Microbiologyopen*, v. 1, n. 3, p. 340-347, 2012

GARCIA-MAZCORRO, J. F. *et al.* Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 80, p. 624-636, 2012.

GEARY, E. L. *et al.* Effects of a mildly cooked human-grade dog diet on gene expression, skin and coat health measures, and fecal microbiota of healthy adult dogs. *Journal Animal Science*. 1 Oct., v. 100, n. 10, p. 265, 2022. Doi: 10.1093/jas/skac265. PMID: 35965387; PMCID: PMC9527297.

GIARETTA, P. R. *et al.* Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.32, p. 1918-1926, 2018.

GUARD, G. C. *et al.* Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, e0127259, 2015.

GRUNDMANN, M. *et al.* Farmacologia de receptores de ácidos graxos livres e seus moduladores alostéricos. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, n. 22, p. 1763.

HANDL, S. *et al.* Fecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiol Ecol*. 2020. Doi:10.1111/1574-6941.12067.

HERSZBERG, E.; PENFIELD, E. Propriedades reológicas do mel dependentes da temperatura. *Journal of Food Engineering*, p. 274, 2020.

HOFFMAN, A. R. *et al.* The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs. *PlosOne*, v. 9, n. 1, e83197, 2021.

HONNEFFER, J. B.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOLSKI, J. S. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol*, n. 28, v. 20, n. 44, p. 16489-16497, 2014.

JENESSA, A. W. *et al.* Clinical Guidelines for Fecal Microbiota Transplantation in Companion Animals. *Advances in Small Animal Care*, n. 5, v. 1, 2024, p. 79-107.

JERICÓ, M. M.; ANDRADE-NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

JOHNSON, J.S., SPAKOWICZ, D.J., HONG, B.Y. *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, v.10, n. 1, p. 5029, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

KELLY, Jr. *et al.* Transferindo o blues: a microbiota intestinal associada à depressão induz mudanças neurocomportamentais no rato. *Journal of Psychiatric Research*, 2016, n. 82, p. 109-118. Doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.07.019.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. *Canine Practice*, Santa Barbara, v. 22, n. 3, p. 10- 15, 1997.

LEAL, A. A. D. *et al.* Bioimpedance analysis: should it be used in morbid obesity? *American Journal of Human Biology*, New York, v. 23, p. 420- 422, 2011.

LEY, R. E. *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. *Cell*, v. 124, p. 837-848, 2006.

LI, K.; YANG, J.; ZHOU, X.; WANG, H.; REN, Y.; HUANG, Y.; LIU, H.; ZHONG, Z.; PENG, G.; ZHENG, C. *et al.* The Mechanism of Important Components in Canine Fecal Microbiota Transplantation. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 695, p. 1-18, 2022. <https://doi.org/10.3390/vetsci9120695>

LI N, W. Q., *et al.* Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis. *Stress*. 2019, sep.; v. 22, n. 5, p. 592-602. Doi: 10.1080/10253890.2019.1617267. Epub 2019 May 24. PMID: 31124390.

LOUIS P.; FLINT, H. J. Formação de propionato e butirato pela microbiota colônica humana. *Environmental Microbiology*, 2017, n. 19, p. 29-41.

LUBBS, D. C. *et al.* Concentração de proteína na dieta afeta a microbiota intestinal de gatos adultos: um estudo usando DGGE e qPCR para avaliar diferenças em populações microbianas no trato gastrointestinal feline. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, n. 93, p. 113-121, 2009.

LUZ, M. R. M. P.; WAIZBORT, R. F. Transplantes de microbiota fecal paratratamento da colite pseudomembranosa (1958-2013): prioridade de descoberta e estilos de pensamento na literatura acadêmica. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 27, p. 859-878, 2020.

MAKIELSKI, K. *et al.* Narrative review of therapies for chronic enteropathies in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. n. 33, p. 11-22, 2019. Disponível em: wileyonlinelibrary.com/journal/jvim. Acesso em: 21 jul. 2024.

MALAJOVICH, M. A. *Biotecnologia: ensino e divulgação*. 2. ed. 2016. 302p.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. *Técnicas de pesquisa: planejamento e execução de pesquisas, amostragens e técnicas de pesquisa, elaboração, análise e interpretação de dados*. 7. ed. São Paulo: Atlas, 277p., 2011.

MARTÍNEZ, J. C. *et al.* Biobancos - una estrategia exigente y esencial para la conservación de muestras biológicas. *Acta Médica Colombiana*. 2012; v. 37, n. 3, p. 158-162.

MIGUEL, P. A. C. Estudo de caso na engenharia de produção: estruturação e recomendações para sua condução. *Revista Produção*, v. 17, n. 1, p. 216-229, 2007.

MINAMOTO, Y. M. *et al.* Prevalence of Clostridium perfringens, Clostridium perfringens enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiol*, 2014. Doi: 10.1016/j.vetmic.10.005.

MINAMOTO, Y. *et al.* Alterations of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease (IBD). *Gut Microbes*, 2022.

MÜLLER, D. C. M.; SCHOSSLER, J. E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice massa corporal humano para cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n.4, p. 1038-1043, 2008.

NORDIN E. *et al.* Modest Conformity Between Self-Reporting of Bristol Stool Form and Fecal Consistency Measured by Stool Water Content in Irritable Bowel Syndrome and a FODMAP and Gluten Trial. *The American Journal of Gastroenterology*, v.117, n. 10, p. 1668-1674, 2022.

OKOYE, K.; HOSSEINI, S. **R programming: statistical data analysis in research**. Springer Nature, 2024.

PEREIRA, G. Q. *et al.* Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 32, p. 707-711, 2018.

PILARSKI, M. M.; MYSZCZUK, A. P. Biobancos: bases para uma legislação brasileira, **Jus Navigandi**, p. 1-19, 2014.

PILLAR, R. *et al.* Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2020.

ROSSI, G. *et al.* Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with IBD. **Plos One**, v. 9, n. 4, e94699, 2014.

REIS, A. C. *et al.* Signs and symptoms suggestive of intestinal dysbiosis in the Brazilian population: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, jul. 2022, p. e56111932094. Doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.32094>.

ROUSE, H. *Mecânica dos Fluidos para Engenheiros Hidráulicos*. Wiley. Imagem da mensuração do composto mimetizado utilizando viscosímetro Brookfield, 1978.

SALGUEIRO, J. B. Biobancos: uma rede por definição. In: CASSIMIRO, Márcia de Cássia; BAVARESCO, Agemir; SOARES, André Marcelo Machado (Org.) *Filosofia, saúde e bioética no Instituto Oswaldo Cruz: novos desafios do século XXI*, Porto Alegre, RS: Editora Fi, 2016, 198 p.

SCHMIDT, M. *et al.* The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. **Plos One**, v. 13, n. 8, p. e0201279, 2018.

SOUZA, G. M. de Otimização de tecnologia de sequenciamento nanopore para detecção rápida de genes de resistência a β -lactâmicos de importância clínica. 2024. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17136/tde-25092024-091148/>. Acesso em: 10 dez. 2025.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 9, p. 1556-1562, 2005.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. e39333, 2012a.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **Plos One**, v. 7, n. 12, e51907, 2012b.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The fecal microbiome in cats with diarrhea. **Plos One**, v. 19, n. 10, p. e0127378, 2015.

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre-and synbiotics—what is the evidence?. **Veterinary medicine and science**, v. 2, n. 2, p. 71-94, 2016.

SUGITA, K. *et al.* Pilot evaluation of a single oral fecal microbiota transplantation for canine atopic dermatitis. *Scientific Reports, Nature Portfolio*, v. 13, p. 8824, 2023.

SUNG, C-H. *et al.* M. Dysbiosis index to evaluate the fecal microbiota in healthy cats and cats with chronic enteropathies. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 24, n. 6, jun. 2022, p. 1-12.

SUAREZ, M. *et al.* Metabolomics: an emerging tool to evaluate the impact of nutritional and physiological challenges. *Trends. Anal Chem*; v. 96, p. 79-88, 2017.

SZOBOSZLAY, M. *et al.* Nanopore Is Preferable over Illumina for 16S Amplicon Sequencing of the Gut Microbiota When Species-Level Taxonomic Classification. *Accurate Estimation of Richness, or Focus on Rare Taxa Is Required. Microorganisms*. V.11, n. 3, p. 804, 2023 doi: 10.3390/microorganisms11030804. PMID: 36985377; PMCID: PMC10059749.

TREMBLAY, J. *et al.* Efeitos do primer e da plataforma no sequenciamento da etiqueta 16s rRNA. *Frontiers in Microbiology*, n. 6, p. 1-15, 2015. DOI: 10.3389/FMICB.2015.00771

THORBURN, A. N. *et al.* Evidências de que a asma é uma doença de origem do desenvolvimento influenciada pela dieta materna e metabólitos bacterianos. *Nature Commun*, 2015, n. 6, p. 7320. Doi: 10.1038/ncomms8320.

TORESSON, L. *et al.* Clinical effects of faecal microbiota transplantation as adjunctive therapy in dogs with chronic enteropathies: a retrospective case series of 41 dogs. *Veterinary Sciences*, v. 10, n. 4, p. 271, 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Resolução nº40/12-CEPE. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2012. Disponível em: <http://www.ufpr.br/soc/ceperesolucoes.php?conselho=CEPE&item_id=14&item=Resolu%E7%F5es%20vigentes>. Acesso em: 21 nov. 2015.

VAN NOOD, E. L. S. *et al.* Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*, v. 368, p. 407-415, 2013.

VAZQUE-BAEZA, Y. *et al.* Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature Microbiology*, n. 1, p. 16177, 2016.

WANG, S. *et al.* Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome*, v. 7, n. 31; v. 7, p. 126, 2019.

YANG, L. L. *et al.* Ácidos graxos de cadeia curta entéricos promovem a proliferação de células progenitoras neurais humanas. *J. Neurochem*, 2020, n. 154, p. 635-646.

YUE, Q. *et al.* O eixo microbiota-intestino-cérebro e epilepsia. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, n. 42, p. 439-453. Doi: 10.1007/s10571-021-01130-2.

ZASLAVSKY, C.; GUERRA, T. C. Escala Bristol de forma fecal no diagnóstico clínico da constipação na infância, Porto Alegre, Brasil. *Revista da AMRIGS*, v. 60, n. 2, p. 129-133, 2016.

ZIKA, E. *et. al.* Biobanks in Europe: prospects for harmonisation and networking. *Seville, Publications Office of the European Union*, 2010. Disponível em: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC57831>. Acesso em: 24 jun. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título do Projeto: Desenvolvimento de um biobanco de fezes caninas para o armazenamento de enemas bioativos destinados ao transplante fecal em cães, como terapia adjuvante ao tratamento de atopias e enteropatias crônicas.

Pesquisador Responsável: Aldo Rodrigues Barbugli Filho.

Razão Social: Associação São Bento de Ensino, **mantenedora** da Universidade de Araraquara.

Ciaep da CEUA responsável pela aprovação: 01010097/2014.

Nome do Responsável pelo animal:

Documento de Identidade:

IDENTIFICAÇÃO DO(S) ANIMAL(IS)

Nome do animal:

Número de identificação: D-01 Espécie:

Raça:

O seu animal está sendo convidado a participar, de forma voluntária, do projeto de pesquisa “Desenvolvimento de um biobanco de fezes caninas para o armazenamento de enemas bioativos destinados ao transplante fecal em cães, como terapia adjuvante ao tratamento de atopias e enteropatias crônicas”, sob a responsabilidade do pesquisador: **Aldo Rodrigues Barbugli Filho**.

Por favor, leia cuidadosamente o texto que segue e qualquer dúvida poderá ser esclarecida.

DECLARO TER SIDO ESCLARECIDO SOBRE OS SEGUINTE PONTOS

1. O trabalho tem por objetivo desenvolver um biobanco de fezes caninas para o transplante fecal, por meio de enemas fecais, preparados em laboratório. O princípio fundamental do transplante fecal envolve a transferência de fezes

de um doador saudável, para o intestino de um receptor, com o objetivo do restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal.

2. A participação do animal doador no estudo ocorrerá em três etapas. Caso o animal não apresente resultados satisfatórios dos exames, sua participação será excluída do grupo de doadores e do presente estudo. Também é livre a desistência do tutor em prosseguir no estudo, em qualquer momento, conforme seu desejo, sem incorrer em nenhum custo ou penalidade.

A **primeria participação do animal** ocorrerá na coleta de amostra de sangue e urina para análise clínica do estado de saúde do animal. Alguns parâmetros séricos deverão ser checados nos candidatos a doadores de fezes, são eles: albumina, cobalamina (B12), folato (vit B9), cortisol basal, fosfatase alcalina, hemograma completo, ureia, creatinina, cálcio total, cálcio iônico, fósforo, triglicerídeos, potássio, sódio, vitamina D, urinálise tipo 01 e UPC, frações colesterol.

Para a coleta do sangue e da urina, o tutor receberá uma guia de exames prescritos pelo médico veterinário responsável pela pesquisa, que deve ser agendado com um laboratório de análises clínicas veterinário, que orientará o tutor sobre os preparativos necessários para a coleta do sangue (por exemplo, jejum) e urina. No dia e horário agendado, o tutor deverá levar o animal ao laboratório, onde será realizada a coleta, seguindo todos os procedimentos padrões. Todos os custos dessas análises serão de responsabilidade do pesquisador, ou seja, o tutor não terá custos em nenhuma etapa da pesquisa. Os laudos dos exames serão encaminhados ao pesquisador/veterinário responsável pela pesquisa, que compartilhará os resultados com o tutor do animal. Se os resultados dos exames de sangue e urina estiverem dentro de parâmetros aceitáveis e seguros, confirmando a anamnese clínica do candidato, o animal seguirá para sua segunda participação, para o exame de ultrassom.

A **segunda participação do animal** será a realização do ultrassom abdominal, com laudo confirmando *status* homeostático do doador. Os exames de imagem não deverão apresentar alterações relevantes, principalmente com relação ao espessamento das mucosas intestinais, anatomia renal, pâncreas, fígado e vesícula biliar. Para o exame de ultrassom, o tutor receberá uma guia de exame, prescrito pelo médico veterinário responsável pela pesquisa. O exame de ultrassom será agendado pelo tutor, que deverá levar seu animal até a clínica veterinária especializada, para a

realização do exame, sem custos para o tutor. O laudo do exame será encaminhado para o pesquisador/veterinário responsável pela pesquisa, que compartilhará os resultados com o tutor.

A **terceira participação do animal** ocorrerá apenas se todos os exames realizados (exame de sangue, urina e ultrassom), estiverem dentro das especificações de normalidade, ou seja, indicarem o estado saudável do cão. Para o cão considerado saudável será agendada data e local, em acordo com o tutor, para a coleta das fezes.

As fezes serão coletadas por meio de defecação espontânea, em local de piso liso, limpo e previamente higienizado, mas sem qualquer tipo de substância que possa comprometer a integridade das fezes, ou sobre cobertura plástica que possa embalar diretamente o material. A coleta e a manipulação do animal será realizada por meio de luva plástica sem bacteriostáticos.

O doador identificado será cadastrado com todos os dados coletados, que chamamos de momento zero, ou seja, logo após a conclusão dos exames da biota intestinal, perfil bacteriológico, exames clínicos e complementares do doador. No cadastro o doador será nomeado (nome e um código), para a identificação das fezes coletadas.

Assim, o material coletado será devidamente rotulado, com data da coleta e código do doador, para o armazenamento em recipientes específicos, nas quantias de fezes frescas de 30 e 60 gramas. As amostras de fezes coletadas dos doadores serão preparadas para armazenamento, de modo que possam ser conservadas para a etapa de sequenciamento.

1. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para o estudo do transplante fecal como alternativa de novo tratamento e de doenças crônicas gastrointestinais e de atopias em cães que sofrem dessas injúrias crônicas.
2. Compreendi que como doador de fezes, o animal não será submetido a nenhum risco. Os exames necessários não são invasivos, além de contribuir para uma avaliação da saúde do animal.
3. Como tutor, reconheço que a participação do meu animal neste projeto será apenas como doador de fezes.
4. Poderei retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento, sem precisar justificar, e não sofrerei qualquer prejuízo.

5. Fui informado e estou ciente de que não há nenhum valor financeiro a receber ou a pagar pela participação do meu animal no estudo.
6. A confidencialidade dos meus dados pessoais será preservada, assegurando assim a minha privacidade. Se for do meu interesse terei livre acesso a todas as informações nãoconfidenciais, e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, ou seja, tudo o que eu desejar saber antes, durante e depois da participação do meu animal na pesquisa. Entendo que as informações confidenciais se referem aos dados de tutores e pacientes.
7. Fui informado que os dados coletados serão utilizados, única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e que os resultados poderão ser publicados.
8. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias, poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.
9. O Médico Veterinário responsável pelo animal será o Dr Aldo Rodrigues Barbugli Filho, Inscrito no CRMV sob o n. 61812. Além dele, a equipe do pesquisador principal também se responsabilizará pelo bem-estar do meu animal durante todo o processo de habilitação do animal como doador, e durante o processo de coleta das fezes. Quando for necessário, posso contatar o pesquisador principal ou a sua equipe pelos contatos: (16) 982126618 e/ou com Comitê de Ética no Uso de Animais, localizado na Rua Voluntários da Pátria, 1309, Centro da cidade de Araraquara - SP, telefone: (16) 3301-7186, e-mail: ceua@uniara.com.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Araraquara – SP ____/____/____



Responsável pelo animal

Dr Aldo Rodrigues Barbugli Filho Pesquisador Responsável

CRMV-SP:61812

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE -

Título do Projeto: Desenvolvimento de um biobanco de fezes caninas para o armazenamento de enemas bioativos destinados ao transplante fecal em cães, como terapia adjuvante ao tratamento de atopias e enteropatias crônicas.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ALDO RODRIGUES BARBUGLI FILHO

Razão Social: Associação São Bento de Ensino, mantenedora da Universidade de Araraquara.

Ciaep da CEUA responsável pela aprovação: 01010097 2014

Nome do Responsável pelo animal:

Documento de Identidade:

IDENTIFICAÇÃO DO(S) ANIMAL(IS)

Nome do animal:

Número de identificação: D-01

Espécie:

Raça:

O seu animal está sendo solicitado para participar, de forma voluntária, do projeto de pesquisa “Desenvolvimento de um biobanco de fezes caninas para o armazenamento de enemas bioativos destinados ao transplante fecal em cães, como terapia adjuvante ao tratamento de atopias e enteropatias crônicas”, de responsabilidade do pesquisador: **Aldo Rodrigues Barbugli Filho**.

Por favor, leia cuidadosamente o texto que segue e qualquer dúvida poderá ser esclarecida.

DECLARO TER SIDO ESCLARECIDO SOBRE OS SEGUINTE PONTOS:

1. O trabalho tem por objetivo desenvolver um biobanco de fezes caninas para o transplante fecal, por meio de enemas preparados em laboratório. O princípio

fundamental do transplante fecal envolve a transferência de fezes de um doador **saudável**, para o intestino de um receptor, com o objetivo do restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal.

2. A participação do meu animal ocorrerá em duas etapas: a primeira consistirá na coleta e análise das fezes do animal. A coleta das fezes será realizada por meio de defecação espontânea. O material coletado será enviado a laboratório qualificado para caracterização da composição bacteriana da biota intestinal. Na segunda etapa ocorrerá o transplante fecal. Fui informado que para tal, será agendado comigo um dia e horário para a realização do transplante de fezes. Receberei um panfleto, com todos os esclarecimentos sobre o procedimento, incluindo os preparativos necessários, que antecedem o transplante. Meu cão deverá ficar em jejum de 12 horas antes do procedimento, e após o mesmo deverá ficar 3 horas sem realizar atividade física, como caminhada. Compreendo que o procedimento de transplante fecal consiste na infusão via sonda retal de uma solução, denominada enema, composta de fezes, previamente preparadas em laboratório, de um doador com absoluto *status* de saúde e biota fecal saudável, comprovada clinicamente. O procedimento não requer anestesia, pois é indolor e rápido, com duração de aproximadamente 10 minutos. Neste estudo, o transplante deverá ser realizado por 3 vezes, com intervalo de 10 dias entre eles, para que seja alcançado o resultado esperado. Meu cão será monitorado durante este período, para registrar sua evolução em relação a sintomas de coceira ou aos distúrbios gastrointestinais, além de avaliar ocorrências não esperadas.
3. Ao participar deste trabalho estarei contribuindo para o estudo do transplante fecal como alternativa de novo tratamento e de doenças crônicas gastrointestinais e de atopias em cães, que sofrem dessas injúrias crônicas. Assim, entendo que se o experimento demonstrar os resultados que a literatura científica vem apontando como promissores, o transplante fecal poderá ser validado e registrado como tratamento.
4. Compreendi que durante a execução da pesquisa, o animal não será submetido a nenhum risco, e que todas as medidas de segurança foram seguidas. Os exames necessários (microbiota fecal), não são invasivos, pois são realizados de amostras das fezes do animal, e o transplante é seguro, por utilizar procedimento já realizado na clínica veterinária, ou seja, de domínio do profissional. Entendo que o animal será

monitorado pelo pesquisador, para avaliar qualquer tipo de ocorrência, que poderá interromper o tratamento, para garantir ao máximo a segurança do animal.

5. Como tutor reconheço que a participação do meu animal neste projeto deverá ter a duração de 30 dias (considerando pequenas variações) entre o primeiro e o terceiro transplante, e também mais 90 dias para acompanhamento da sua evolução clínica.
6. Poderei retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento, sem precisar justificar, e não sofrerei qualquer prejuízo. Tenho ciência que a interrupção do tratamento não causará danos ou efeitos colaterais ao animal, mas não garantirá os resultados esperados.
7. Fui informado e estou ciente de que não há nenhum valor financeiro a receber ou a pagar, pela participação do meu animal no estudo.
8. A confidencialidade dos meus dados pessoais será preservada, assegurando assim a minha privacidade. Se for do meu interesse terei livre acesso a todas as informações nãoconfidenciais, e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, ou seja, tudo o que eu desejar saber antes, durante e depois da participação do meu animal na pesquisa. Entendo que as informações confidenciais referem-se aos dados de tutores e pacientes.
9. Fui informado que os dados coletados serão utilizados, única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e que os resultados poderão ser publicados.
10. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.
11. O Médico Veterinário responsável pelo seu animal será o Dr Aldo Rodrigues Barbugli Filho, Inscrito no CRMV sob o n. 61812. Além dele, a equipe do pesquisador principal também se responsabilizará pelo bem-estar do meu animal durante todo o estudo. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, posso contatar o pesquisador principal ou a sua equipe pelos contatos: (16) 982126618 e/ou com Comitê de Ética no Uso de Animais, localizado na Rua Voluntários da Pátria, 1309, Centro da cidade de Araraquara - SP, telefone: (16) 3301-7186, e-mail: ceua@uniara.com.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Araraquara - SP ___/___/___



Responsável pelo animal

Dr Aldo Rodrigues Barbugli Filho Pesquisador Responsável

CRMV-SP: 61812

APÊNDICE C

QUESTIONÁRIO ANAMNÉTICO

Nome do tutor: _____ Nome do Pet : _____

Fone do tutor: _____ Idade do pet: _____

e-mail do tutor: _____ Raça do pet: _____

Data e cidade : _____

☀ Informe qual a queixa principal do seu pet

Coceira Fezes moles ou diarreia Apetite seletivo

☀ Desde quanto ocorre esta queixa ?

Menos de 01 ano Mais de 01 ano Mais de 02 ano

☀ Com que frequencias as crises ocorrem ?

Coça todo dia As crises piores de coceira ocorrem mais de uma vez por mês

Desconforto gastro intestinal ocorre mais de uma vez por mês ?

Desconforto gastro intestinal ocorre menos de uma vez por mês ?

☀ Qual a intensidade do desconforto ? * coceira ou disturbio gastro

Atualmente baixo mas já foi bem intenso Intenso

☀ Com que frequencia você precisou recorrer a ajuda veterinária nos ultimos 12 meses ? Referente a queixa principal

Mais de 01 vez Mais de 03 vezes

☀ A quanto tempo seu pet faz uso de medicação continua como corticoide ou apoquel, ou ciclavance ou cytopoint ?

Não faz uso atualmente Menos de 01 ano Mais de 01 ano

☀ Seu pet tomou antibiotico nos últimos 30 dias ?

Sim Com certeza não Não sei ou não lembro

☀ Qual seu veterinário ? Nome e ou clinica : _____



APÊNDICE D

Orientações gerais & ocorrências

Seguem algumas orientações importantes no acompanhamento do seu pet durante avaliação do tratamento experimental via transplante fecal

- 1) Caso o animal seja conduzido ao veterinário por qualquer motivo durante o período de avaliação, solicitamos ser informados.
- 2) Não medique seu animal, exceto com os medicamentos de uso contínuo já presentes, sem antes consultar seu veterinário e neste caso solicitamos ser informados.
- 3) O seu pet não poderá tomar quaisquer medicamentos, exceto os medicamentos de uso contínuo, declarados previamente na triagem e seleção prévia dos voluntários. O uso de qualquer tipo de antibiótico, oral, injetável ou tópico, excluirá o mesmo do tratamento implantado.
- 4) Caso ocorra qualquer intercorrência durante o tratamento, que necessite encaminhar o animal ao veterinário, solicitamos ser informados imediatamente.
- 5) A rotina diária deverá ser mantida, horários de refeição, passeios, creches, banho e tosa, etc...
- 6) Sobre os banhos, caso o animal utilize produtos específicos para pele e pelo, conforme prescrito previamente pelo veterinário, deverão ser mantidos, exceto produtos bacteriostáticos como cloresten, a base de clorexidina. Neste caso, isto já terá sido avaliado na triagem e devidamente dialogado com o médico veterinário a suspensão temporária do mesmo para validação da participação no tratamento experimental.
- 7) Ainda sobre banhos, o serviço de banho e tosa deverá ser informado sobre o não uso de produtos a base de clorexidina durante o tratamento experimental.
- 8) Durante o experimento o animal não poderá passar por qualquer procedimento cirúrgico eletivo. Em caso de alguma intercorrência que necessite uma cirurgia não eletiva, solicitamos ser informados e o animal estará excluído do experimento.
- 9) Quaisquer intercorrências durante o experimento como eventuais acidentes, brigas, mudança de residência, viagem, solicitamos ser informados.
- 10) Dentro dos preceitos éticos devidamente respeitados e compartilhados, estaremos monitorando seu animal durante o tratamento, com mínima ou nenhuma interferência na rotina diária bem como quaisquer outros desconfortos. O mesmo será realizado via troca de mensagens semanais (uma vez por semana) via what's app.

APÊNDICE E

Orientações sobre nutrição e dieta

Seguem algumas orientações importantes sobre a dieta do seu pet durante avaliação do tratamento experimental via transplante fecal

- 1) A dieta informada na seleção e triagem do seu pet deverá ser mantida, seja ração ou alimentação natural. Esta manutenção refere-se ao tipo de alimento ofertado, bem como as devidas quantias diárias.
- 2) Qualquer mudança na dieta, seja troca de ração ou fórmula da dieta natural, solicitamos ser informados e neste caso o animal será excluído do tratamento.
- 3) Durante o tratamento está vetado o fornecimento de petiscos, biscoitos, "guloseimas" fora do que foi devidamente informado previamente na triagem e seleção dos voluntários.
- 4) Nenhum alimento diferente deverá ser ofertado durante o tratamento.
- 5) Solicitamos máxima atenção nos finais de semana, participação do pet em churrascos, eventuais "acidentes" via oferta desavisada de guloseimas por parentes ou amigos.
- 6) Caso o pet tenha serviço de adestramento, dog walker, visitas em creches, solicitamos prévio diálogo com estes serviços para não fornecer petiscos durante o tratamento.
- 7) No caso de alimentação natural, se a dieta não for fixa, solicitamos interromper o rodízio de cardápios, mantendo durante o período experimental uma dieta fixa a ser definida pelo tutor com base na preferência do pet sobre os cardápios já ofertados. Neste caso solicitamos também não mudar de fornecedor, caso faça uso de serviços de marmitaria pet ou marca industrial de alimento úmido.
- 8) Se existir previamente um manejo nutricional de fornecimento de frutas, o mesmo será mantido. Sobre isto definiremos, em concordância, na triagem, quais as frutas permitidas, a quantidade e dias de oferta.
- 9) A ideia principal é manter certa disciplina alimentar durante o tratamento experimental, sendo esta dieta previamente compartilhada e informada na triagem e seleção do voluntário.

APÊNDICE F

Documento Oficial Comitê ÉTICA

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: no. 075.23

Título do projeto Desenvolvimento de um biobanco de fezes caninas para o armazenamento de enemas bioativos destinados ao transplante fecal em cães, como terapia adjuvante ao tratamento de atopias e enteropatias crônicas.

Pesquisador responsável: Aldo Rodrigues Barbugli Filho

PARECER

A solicitação de alteração do número de animais de 22 para 26 referentes ao Projeto de Pesquisa intitulado "Desenvolvimento de um biobanco de fezes caninas para o armazenamento de enemas bioativos destinados ao transplante fecal em cães, como terapia adjuvante ao tratamento de atopias e enteropatias crônicas", sob responsabilidade de Aldo Rodrigues Barbugli Filho com as colaborações de Creusa Sayuri Tahara Amaral, Regiane Travensolo e Eliane Trovatti, foi analisada por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo. " desenvolver um modelo de biobanco de fezes caninas, considerando para tal o desenvolvimento do processo de seleção dos doadores, o armazenamento e conservação das microbiotas caninas pela produção de enemas, visando o transplante fecal. O enema fecal é uma adaptação de uma técnica rotineira, enema de retenção, que consiste na inserção de fluidos no reto, por meio de equipamentos apropriados, de modo que os fluidos possam permanecer por períodos relativamente longos e ser absorvidos pelo colón. No enema fecal, os fluidos terapêuticos são substituídos por uma solução diluída de fezes. O biobanco permitirá a realização da aplicação da biotecnologia básica de transplante de microbiota fecal em cães, especialmente para os portadores de dermatites ou enteropatias crônicas. O projeto será desenvolvido com o apoio do Núcleo de Inovação em Biotecnologia - BioInova e do Laboratório de Biomateriais e Biotecnologia da UNIARA. "

A análise do pedido de alteração do número de animais solicitada não contraria os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto ne 6.899, de 15 de julho de 2009. e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Assim, a solicitação foi APROVADA por este Comitê.

Araraquara, 30 de maio de 2025

Dr. Wilton Rogério Lustrí

Coordenador do Comitê de Ética em Uso de Animais

APENDICE G

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

Título: ENEMA FECAL DE RETENÇÃO PARA TMF EM CÃES

Número: EF- 001

Versão: V1

Data de emissão:

Data de revisão:

Elaborado por:

Aprovado por:

1. Objetivo

Estabelecer um protocolo padronizado para o preparo de enemas fecais de retenção , para a realização de transplante fecal em cães com doenças inflamatórias crônicas (ex.: dermatite atópica, enteropatias), garantindo segurança, eficácia e rastreabilidade.

2. Recursos necessários

Materiais para a coleta das fezes: Recipiente de plástico 500 mL; Luvas, retângulo de plástico descartável.

Materiais para o preparo do enema: Tubo Falcon® de 50 mL, glicerol 10%, balança de precisão, solução salina 0,9%, agitador de tubos Vortex®, espátulas, aparelho medidor de umidade em tempo real , consistômetro, viscosímetro, luvas plásticas de manuseio laboratorial, recipiente de plástico, saco de confeitaria.

Equipamento para a conservação enema: Ultra freezer (- 80°C).

3 Procedimento - checklist

Item	Descrição da ação	Responsável	Verificação
1	Coletar fezes <ul style="list-style-type: none"> • Posicionar o animal sobre o retângulo de plástico descartável no momento da evacuação • Coletar as fezes e armazená-las no recipiente de plástico Obs. As fezes podem ser mantidas em refrigeração simples por 24 h para aguardar a formação de maior quantidade de fezes.	Auxiliar laboratório	
2	Pesagem e peneira <ul style="list-style-type: none"> • Pesar o material coletado • Peneirar as fezes para eliminar restos de alimentos e outros elementos 	Auxiliar Laboratório	
3	Checagem umidade <ul style="list-style-type: none"> • Medir a umidade das fezes 	Técnico Laboratório	
4	Adição (10%) glicerol <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar glicerol na proporção de 10% do peso de fezes 	Técnico Laboratório	
5	Tubo Falcon® 50 mL e congelamento <ul style="list-style-type: none"> • Inserir o enema nos sacos de confeitar • Encher os tubos com 50 mL de enema 	Técnico Laboratório	
6	Armazenar os tubos no Ultra Freezer a - 80 ° C.		

4. Critérios de aceitação da solução

Conferencia da umidade das fezes na coleta * valor esperado: 70%

Conferencia da Viscosidade * valor esperado: xxxxxxxx

5. Documentação e registros

6. Revisão e controle de alterações

7. Histórico de Revisões

Versão	Data	Descrição das alterações	Responsável
1.0 Original	10/06/2025	Primeira versão	Aldo R. Barbugli F.
1.1			
1.2			

8. Assinaturas

Elaborado por: [Nome e cargo]

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Aprovado por: [Nome e cargo]

Assinatura: _____

Data: ____/____/____