

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA
GÁSTRICA E SUA CORRELAÇÃO COM O CONTEÚDO DE
FIBRAS NA DIETA DE PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO E CONTROLES SEM
CÂNCER**

LUCAS OLIVEIRA MONÇÃO

**Dissertação apresentada a Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Orientadora: Dra. Diana Noronha Nunes

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

M737a Monção, Lucas Oliveira
Avaliação da composição da microbiota gástrica e sua correlação com o conteúdo de fibras na dieta de pacientes com adenocarcinoma gástrico e controles sem câncer / Lucas Oliveira Monção- São Paulo, 2021.
103p.
Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientadora: Diana Noronha Nunes

Descritores. 1. ADENOCARCINOMA GÁSTRICO 2. FIBRAS ALIMENTARES
3. MICROBIOTA

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

“Agora, pois, permanece a fê, a esperança e a
caridade, estas três, mas a maior destas é a caridade”
(1 Coríntios 13:13)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, em especial a meus pais **Eliane** e **Wanderley**, minha Irmã **Julia** e a minha esposa **Alessandra**, que sempre estiveram ao meu lado, muito antes de iniciar o mestrado! Sempre me apoiaram e acreditaram no meu sonho de trabalhar com oncologia, que surgiu no início da graduação em nutrição.

Gostaria de agradecer a todos do laboratório de Genômica médica do A.C. Camargo Cancer Center, em especial a minha orientadora **Dra. Diana Nunes** e ao meu coorientador **Dr. Emmanuel Dias-Neto**, que acreditaram no meu potencial e me aceitaram como aluno, mesmo naquele momento que eu não tendo muito conhecimento na parte prática de laboratório. Lembro como se fosse hoje, minha felicidade em estar iniciando um mestrado em um dos maiores centros de tratamento do país! Aquele momento reforçou meu sentimento de ajudar o próximo muito além da assistência no consultório, mas na pesquisa.

Nessa trajetória, fui muito ajudado, afinal ninguém faz nada sozinho! Gostaria de agradecer a **Dra. Thais Bartelli** e ao **Bruno Moda** que me ensinaram meus primeiros passos para programar no R (mesmo no início eu imaginando que seria impossível aprender aquilo) e que inclusive merecem um prêmio pela paciência que tiveram. Agradeço a enfermeira de pesquisa **Laís Senda** que me ajudou muito nos recrutamentos e coletas de amostra, e também as técnicas **Gabriela Branco** e **Luana Batista** que me auxiliaram no processamento das amostras biológicas e me ensinaram a fazer extração de DNA.

Agradeço a **Isabella Kuniko** por todas as conversas sobre as coisas da vida e também pela super ajuda na fase de preparo das amostras para o sequenciamento. Agradeço ao **Dr. Israel Tojal** e seu grupo de bioinformática que me ajudou a montar e converter a frequência de consumo alimentar do questionário de frequência alimentar em ingestão calórica e de fibras e também ao **Alexandre Defelicibus** que me auxiliou na aplicação dos filtros de qualidade nos dados após o sequenciamento.

Agradeço o professor **Vinicius Cavalcante** por ter me ensinado toda base de estatística, e a **Janaina Germano**, que em um certo período fez reuniões semanais validando as análises que eu construí.

Agradeço ao apoio financeiro da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** no que se refere aos custos de processamento e sequenciamento das amostras utilizadas nesse projeto.

Agradeço aos meus **Abner, Arthur, Samuel, Renan, Vinicius**, e também aos amigos que a nutrição oncológica me deu de presente: **Ana Coutinho, Priscila Goretti e Gisele Vieira, Tamires Santana** e a **Dra. Ana Baccarin**, que de alguma forma me ajudaram a seguir até o fim. Agradeço de coração a todos meus pacientes e a toda equipe do Instituto Ana Baccarin, que juntos lutamos por dar mais saúde e qualidade de vida aos nossos pacientes.

Por fim, e não menos importante, agradeço a Deus que sem ele nada disso seria possível! Me dá força nos dias mais felizes e também nos mais tristes. Quando eu acho que não vou conseguir, minha fé é uma alavanca para seguir e lutar pelos meus sonhos.

RESUMO

Monção LO. **Avaliação da composição da microbiota gástrica e sua correlação com o conteúdo de fibras na dieta de pacientes com adenocarcinoma gástrico e controles sem câncer.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

O adenocarcinoma gástrico é uma das neoplasias mais incidentes no Brasil e no mundo. Sua etiologia é de causa multifatorial. Em relação à dieta, o grau de processamento empregado na produção dos alimentos, condiciona o perfil de nutrientes. Desta forma, em populações com estilo de vida ocidental é crescente o consumo de alimentos ultraprocessados que pode condicionar uma dieta menos diversa, com contribuição de gorduras saturadas, carboidratos simples e conseqüente baixa ingestão de fibras. As fibras alimentares exercem efeitos protetores e parecem ter papel auxiliar na diminuição da ocorrência de alguns tipos de câncer, como o colorretal; efeito este ligado a interação entre as fibras e o microbioma intestinal. Porém, apesar do estômago ser um órgão colonizado por bactérias, pouco se sabe sobre inter-relação entre a dieta e principalmente a ingestão de fibras alimentares e sua ação sobre o microbiota gástrica de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico, visto que os estudos se limitam principalmente a análises a nível intestinal. Dessa forma, o estudo aqui apresentado teve como objetivo apresentar evidências biológicas da relação entre a ingestão de fibras alimentares com a composição da microbiota gástrica de lavado gástrico de indivíduos com adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos. Tais evidências incluíram desde a caracterização da ingestão alimentar e diferenças entre os grupos avaliados, até a correlação entre as variáveis dietéticas com o perfil taxonômico de bactérias estomacais. Para quantificação dietética utilizamos um questionário de frequência alimentar e convertemos a quantidade de gramas de alimentos em contribuição do percentual calórica da dieta de acordo com o grau de processamento e em gramas de fibras para cada 1000 kcal ingerida, com bases em tabelas de composição de alimentos. Para análise de microbiota, após extração de DNA do suco gástrico, foi utilizado a abordagem de sequenciamento do gene codificador do rRNA sub-unidade 16s. Para o primeiro módulo desse trabalho identificamos que o grupo com câncer possui uma maior ingestão de alimentos ultraprocessados e menor ingestão de fibras, quando comparado com os controles. Por meio de um modelo de regressão logística multinomial, essas diferenças resultam em: uma maior ingestão de fibras insolúveis e menor

de alimentos ultraprocessados estar mais associada com o grupo controle endoscópico, quando comparado com os indivíduos com câncer (OR 2,651, IC 95% 1,069-6,573, $p=0,035$) e (OR 2,521, IC 95% 1,076-5,905, $p=0,033$) respectivamente. Em termos de composição da microbiota estomacal, no grupo adenocarcinoma gástrico identificamos que as fibras totais possuem uma correlação positiva com o filo Firmicutes ($r\hat{o}= 0.53$; $p= 0,021$). Este mesmo tipo de fibras possui correlação forte e negativa com o filo Proteobacteria ($r\hat{o}= -0.58$; $p= 0,011$). No grupo de controles endoscópicos, as fibras insolúveis apresentaram uma correlação negativa com as Proteobactérias. A nível de gênero, de acordo com o algoritmo de Lefse, identificamos 17 gêneros diferencialmente abundantes no grupo controle com alta ingestão de fibras (Q4 = $>14g/ 1000kcal$), versus com baixa ingestão (Q1= $<8,5g/1000 kcal$), com destaque para os gêneros *Mogibacterium*, *Prevotella* 7, *Fusobacterium* e *Actinomyces*, que se mostraram enriquecidos na dieta rica em fibras. Para o grupo com câncer, no quartil 1 observamos 4 gêneros diferencialmente abundantes, sendo eles: *Butyrivibrio*, *Helicobacter* e *Stomatobaculum*. Comparando indivíduos do grupo AdG do Q1 (N=24) versus Controles do Q4 (N=26), o gênero *Abiotrophia* foi mais abundante nos controles, e *Escherichia_shigella*, um gênero patogênico, foi mais frequente no AdG. Na diversidade total, evidenciamos uma maior influência das fibras no grupo controle. Por fim, concluímos que as fibras alimentares podem influenciar a microbiota antes do desenvolvimento da doença, visto que, no grupo controle endoscópicos os achados mostraram não apenas uma maior riqueza total de gêneros bacterianos, mas uma maior abundância de bactérias específicas. Esses resultados bem distintos entre casos e controles podem estar associados com o fato, dos indivíduos com câncer já terem uma doença instalada, com conseqüente disbiose. Destacamos nos controles com alto consumo de fibras, uma maior abundância de gêneros produtores de ácidos graxos de cadeia curta e importante atividade imunomodulatória. Já no grupo AdG identificamos gêneros com um perfil pró-inflamatório, como a *Helicobacter*.

ABSTRACT

Monção LO. [Evaluation of gastric microbiota composition and its correlation with fiber content in the diet of patients with gastric adenocarcinoma and cancer-free controls]. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

Gastric adenocarcinoma is one of the most common neoplasms in Brazil and in the world. Its etiology has a multifactorial cause. In relation to diet, the degree of processing used in food production conditions the nutrient profile. Thus, in populations with a Western lifestyle, the consumption of ultra-processed foods is increasing, which can lead to a less diverse diet, with the contribution of saturated fats, simple carbohydrates and consequent low fiber intake. Dietary fibers have protective effects and seem to have an auxiliary role in reducing the occurrence of some types of cancer, such as colorectal; This effect is linked to the interaction between fibers and the intestinal microbiome. However, despite the stomach being an organ colonized by bacteria, little is known about the interrelationship between diet and especially dietary fiber intake and its action on the gastric microbiota of patients with gastric adenocarcinoma, since studies are mainly limited to intestinal analyses. Thus, the study presented here aimed to present biological evidence of the relationship between dietary fiber intake and the composition of the gastric microbiota of gastric lavage from individuals with gastric adenocarcinoma and endoscopic controls. Such evidence ranged from the characterization of food intake and differences between the groups evaluated, to the correlation between dietary variables with the taxonomic profile of stomach bacteria. For dietary quantification, we used a food frequency questionnaire and converted the amount of grams of food into the contribution of the caloric percentage of the diet according to the degree of processing and in grams of fiber for each 1000 kcal ingested, based on food composition tables. For microbiota analysis, after extracting DNA from gastric juice, the approach of sequencing the gene encoding the 16s rRNA subunit was used. For the first module of this work, we identified that the cancer group has a higher intake of ultra-processed foods and lower fiber intake when compared to controls. Using a multinomial logistic regression model, these differences result in: a higher intake of insoluble fiber and lower intake of ultra-processed foods being more associated with the endoscopic control group when compared to individuals with cancer (OR 2.651, 95% CI 1.069 -6.573, $p=0.035$) and

(OR 2.521, 95% CI 1.076-5.905, $p=0.033$) respectively. In terms of the composition of the stomach microbiota, in the gastric adenocarcinoma group we identified that the total fibers have a positive correlation with the Firmicutes phylum ($r\hat{o} = 0.53$; $p = 0.021$). This same type of fiber has a strong and negative correlation with the Proteobacteria phylum ($r\hat{o} = -0.58$; $p = 0.011$). In the group of endoscopic controls, insoluble fibers showed a negative correlation with Proteobacteria. At the genus level, according to the Lefse algorithm, we identified 17 differentially abundant genus in the control group with high fiber intake (Q4 = $>14g/1000kcal$), versus low intake (Q1 = $<8.5g/1000 kcal$), with emphasis on the genera *Mogibacterium*, *Prevotella* 7, *Fusobacterium* and *Actinomyces*, which were enriched in the fiber-rich diet. For the cancer group, in quartile 1 we observed 4 differentially abundant genera, namely: *Butyrivibrio*, *Helicobacter* and *Stomatobaculum*. Comparing individuals from the Q1 AdG group (N=24) versus Q4 controls (N=26), the *Abiotrophia* genus was more abundant in the controls, and *Escherichia_shigella*, a pathogenic genus, was more frequent in AdG. In total diversity, we evidenced a greater influence of fibers in the control group. Finally, we conclude that dietary fiber can influence the microbiota before the development of the disease, since, in the endoscopic control group, the findings showed not only a greater total richness of bacterial genus, but also a greater abundance of specific bacteria. These very different results between cases and controls may be associated with the fact that individuals with cancer already have an installed disease, with consequent dysbiosis. We highlight in controls with high fiber consumption, a greater abundance of genus producing short-chain fatty acids and important immunomodulatory activity. In the AdG group, we identified genus with a pro-inflammatory profile, such as *Helicobacter*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de carcinogênese associado a <i>Helicobacter pylori</i>	03
Figura 2	Métodos de estudo da comunidade microbiana (gene 16S RNA e Shotgun)	05
Figura 3	Composição e abundância das bactérias no trato gastrointestinal	06
Figura 4	Comparação com as médias de ingestão de energia total e fibras da população Brasileira - no período de 2017-2018.....	11
Figura 5	Os cenários metabólicos divergentes de uma dieta rica em carboidratos acessíveis a microbiota (CAMs) <i>versus</i> uma dieta pobre em CAMs.....	13
Figura 6	Ingestão energética de acordo com a faixa etária dos sujeitos incluídos no estudo	24
Figura 7	Comparação múltipla da contribuição energética de alimentos in natura e ultraprocessados na dieta.....	29
Figura 8	Proporção do consumo das frutas e hortaliças que apresentaram diferença estatística na comparação entre os grupos no Apêndice 4	30
Figura 9	Comparação múltipla da ingestão de fibras	32
Figura 10	Participação dos grupos alimentares ao longo dos quartis de consumo das fibras totais	34
Figura 11	Curva de sobrevida global e doença específica de toda coorte	40

Figura 12	Curvas de sobrevida global e por doença específica de indivíduos com adenocarcinoma gástrico de toda coorte, estratificado pelos quartis de consumo de alimentos in natura, processados e ultraprocessados.....	41
Figura 13	Curvas de sobrevida global e por doença específica de indivíduos com adenocarcinoma gástrico de toda coorte, estratificado pelos quartis de consumo de fibras totais, solúveis e insolúveis	42
Figura 14	Curvas de sobrevida por doença específica de indivíduos com adenocarcinoma gástrico de toda coorte, estratificado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico	43
Figura 15	Curva de saturação das 145 amostras sequenciadas pela técnica 16S	48
Figura 16	Análise comparativa da abundância dos filos bacterianos encontrados no lavado gástrico de pacientes apresentando adenocarcinoma gástrico, ou controles sem câncer	51
Figura 17	Análise comparativa da abundância relativa dos filos bacterianos que apresentaram diferença estatística na estratificação pelo resultado da endoscopia digestiva alta quando casos de AdG foram comparados com tecido normal, ou gastrite superficial	52
Figura 18	Abundância de bactérias a nível de gêneros entre casos e controles	53
Figura 19	Análise comparativa da abundância relativa entre os top 20 filos bacterianos entre casos e controles.....	56
Figura 20	Análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (<i>LEfSe</i>) entre casos e controles	58
Figura 21	Abundância relativa de gêneros diferencialmente abundantes, identificados na análise por <i>LEfSe</i> no grupo AdG.....	60

Figura 22	Abundância relativa de gêneros diferencialmente abundantes, identificados na análise por LEfSe no grupo controle endoscópico.....	61
Figura 23	Medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico entre casos com adenocarcinoma gástrico e controles endoscópico	64
Figura 24	Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico entre casos com Adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos.....	65
Figura 25	Medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico entre casos com adenocarcinoma gástrico e controles estratificados pelos achados endoscópicos (resultado da endoscopia digestiva alta)	67
Figura 26	Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico entre casos com adenocarcinoma gástrico e controles estratificados pelos achados endoscópicos (resultado da endoscopia digestiva alta)	68
Figura 27	A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (<i>LEfSe</i>) entre os indivíduos com câncer e subgrupo dos controles que possuem exame normal ou com gastrite superficial na endoscopia.....	69
Figura 28	Medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico de indivíduos do grupo AdG, estratificado pela classificação histológica de Lauren	72
Figura 29	A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (<i>LEfSe</i>) entre os indivíduos com câncer estratificado pelo subtipo histológico de Lauren.....	73
Figura 30	Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico de indivíduos do grupo AdG, estratificado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico	74
Figura 31	A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (<i>LEfSe</i>) entre os indivíduos com câncer estratificado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico	74

Figura 32	Matrix de correlação entre variáveis dietéticas e os filos bacterianos nos grupos A) Adenocarcinoma Gástrico e B) Controles endoscópicos.....	76
Figura 33	A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LEfSe) entre casos e controles estratificados pelo consumo de fibras alimentares	78
Figura 34	Comparação múltipla entre as medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico dos grupos AdG e controles endoscópicos, estratificado pelos quartis de consumo de fibra totais.....	81
Figura 35	Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico entre os quartis de ingestão de fibra alimentar total nos grupos de casos com Adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos	84
Figura 36	Comparação entre as medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico dos grupos AdG e controles endoscópicos, estratificada pela mais baixa ingestão de fibras (Q1) versus os demais quartis	84
Figura 37	Comparação entre as medidas de diversidade beta nas amostras de fluido gástrico dos grupos AdG e controles endoscópicos, estratificado pela mais baixa ingestão de fibras (Q1) versus os demais quartis	85
Figura 38	A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LEfSe) comparando casos versus controles, quando estratificados pela baixa (Q1) e alta (Q4) ingestão de fibras	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições de amplificação do gene 16S (regiões V3-V4) utilizadas neste estudo.....	21
Tabela 2	Condições de termociclagem para amplificação do gene 16S (regiões V3-V4) utilizadas neste estudo	21
Tabela 3	Estrutura racional do questionário de frequência alimenta	23
Tabela 4	Racional para padronização do consumo alimentar diário.....	23
Tabela 5	Caracterização geral da coorte incluída no estudo	27
Tabela 6	Ingestão de fibras entre os sujeitos do estudo.....	32
Tabela 7	Participação dos grupos alimentares ao longo dos quartis de consumo das fibras totais	35
Tabela 8	Associação entre variáveis de estilo de vida e hábitos alimentes entre os grupos controles versus adenocarcinoma gástrico, conforme determinado pela regressão logística multinomial	38
Tabela 9	Modelo de regressão multivariada de Cox para doença específica nos indivíduos do grupo AdG	44
Tabela 10	Características clínicas e de estilo de vida de um subgrupo de casos e controles, que tiveram o microbioma do lavado gástrico avaliado	45
Tabela 11	Abundância relativa (%) de filos entre os grupos AdG e controles endoscópicos.....	50

Tabela 12	Abundância relativa dos 20 gêneros bacterianos mais abundantes entre casos e controles	54
Tabela 13	Avaliação da diversidade alfa entre os grupos casos e controles	64
Tabela 14	Avaliação da diversidade alfa entre os grupos AdG e controles sem câncer, estratificado pelos quartis de consumo de fibra alimentar total	82

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Celsius
AACR	No inglês <i>American Association for Cancer Research</i>
AdG	Adenocarcinoma gástrico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CAMs	Carboidratos acessíveis à microbiota
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Câncer gástrico
CID	No inglês <i>International Classification of Diseases</i> , traduzido Classificação Internacional de Doenças
CO ²	Dióxido de carbono
DNA	Em inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> , traduzido ácido Desoxirribonucleico
DRI	No inglês <i>Dietary Reference Intakes</i> , traduzido
ERK	No inglês <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> , traduzido quinase regulada por sinal extracelular
FLOT4	5-Fluorouracil, leucovorina, oxaliplatina e docetaxel
g	Gramma
H ²	Hidrogênio
HR	No Razard ratio, traduzido razão de risco
IARC	No inglês, traduzido Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de massa corporal
IOM	No inglês <i>Institute of Medicine</i> , traduzido Instituto de Medicina
Kcal	Quilocaloria
LDA	No inglês <i>Linear discriminant analysis</i> , traduzida análise discriminante linear
LefSe	No inglês <i>Linear discriminant analysis effect size</i> , traduzido em medidas de tamanho de efeito
M	Molar
Ng	Nanograma

OR	No inglês Odds ratio, traduzido razão de chances
OTUs	No inglês <i>Operational Taxonomic Units</i> , traduzido unidade taxonômica operacional
PCR	Em inglês polymerase chain reaction, traduzida reação em cadeia da polimerase
PI3K	No inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> , traduzido fosfatidilinositol 3-quinase
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
QFA	Questionário de frequência alimentar
QTneo	Quimioterapia neoadjuvante
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
TCGA	Do inglês <i>The Cancer Genome Atlas Research Network</i> (TCGA), traduzido como Rede de Pesquisa do Atlas do Genoma do Câncer
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	No inglês Tumour Necrosis Factor alpha, traduzido Fator de Necrose Tumoral Alfa
uM	Micromolar
UNICAMP	Universidade estadual de campinas
MI	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer gástrico	1
1.2	Helicobacter pylori e o câncer gástrico.....	2
1.3	A microbiota humana	4
1.4	Ocidentalização da dieta e seu impacto na microbiota	7
1.5	Fibras alimentares e microbiota gástrica	10
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	CASUÍSTICA E METODOLOGIA	17
3.1	Aspectos Éticos.....	17
3.2	População de estudo e amostras	17
3.3	Critérios de inclusão dos casos	18
3.4	Critérios de inclusão de controles endoscópicos	18
3.5	Critérios de inclusão dos controles da campanha de prevenção	18
3.6	Critérios de exclusão de casos e controle	18
3.7	Métodos	19
3.7.1	Amostras biológicas e processamento	19
3.7.2	Extração de ácidos nucleicos (DNA).....	19
3.7.3	Análises de bactérias da microbiota por avaliação do gene 16s do RNA Ribossomal	22
3.7.4	Caracterização de hábitos de vida e perfil alimentar	22
3.7.5	Covariáveis	24
3.7.6	Análise Estatística.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Módulo 1: ingestão alimentar e associações entre casos e controles.....	26
4.1.1	Descrição geral da coorte avaliada no estudo.....	26
4.1.2	Caracterização do perfil alimentar de casos e controles	28

4.1.3	Caracterização da ingestão de fibras alimentares e sua associação com a dieta.....	31
4.1.4	Análise de sobrevivência entre os indivíduos com adenocarcinoma gástrico e associações com variáveis dietéticas	32
4.2	Módulo 2: análise do bacterioma através do sequenciamento do gene 16s do RNA ribossomal.....	45
4.2.1	Caracterização e diferenças entre casos e controles	45
4.2.2	Diferenças entre os indivíduos com adenocarcinoma gástrico de acordo com as variáveis clínicas.....	71
4.3	Módulo 3: correlação entre a microbiota gástrica e os contribuintes dietéticos	75
5	CONCLUSÕES	88
5.1	Conclusões módulo I	88
5.2	Conclusões módulo II	88
5.3	Conclusões módulo III.....	89
5.4	Conclusões finais.....	90
6	REFERÊNCIAS	91

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Projeto Temático
- Anexo 2** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa deste projeto
- Anexo 3** Termo de consentimento livre e esclarecido para casos – Dados epidemiológicos
- Anexo 4** Termo de consentimento livre e esclarecido para controles – Dados epidemiológicos
- Anexo 5** Termo de consentimento livre e esclarecido para casos e controles para amostras biológicas

APÊNDICES

- Apêndice 1** Contribuição dos alimentos in natura/minimamente processados
- Apêndice 2** Contribuição de alimentos processados
- Apêndice 3** Contribuição de alimentos ultraprocessados na dieta
- Apêndice 4** Regressão logística multinomial univariada de fatores de estilo de vida

e dietéticos

- Apêndice 5** Diversidade alfa entre os quartis e fibras insolúveis.
- Apêndice 6** Diversidade alfa entre os quartis e fibras solúveis.
- Apêndice 7** Diversidade beta entre os quartis e fibras in solúveis entre casos e controles endoscópicos.
- Apêndice 8** Diversidade beta entre os quartis e fibras in solúveis entre casos e controles endoscópicos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia mais incidente no mundo, com 1 milhão de novos casos e 783 mil mortes em 2018 ¹. Nos últimos anos houve uma redução deste número em países ocidentais, porém o Brasil ainda apresenta uma incidência alta, com 21.230 casos/ano para o triênio de 2020-2022 ^{2,3}. Na grande maioria dos casos, os pacientes são assintomáticos e por consequência, o diagnóstico é realizado de forma tardia. Quando há sintomas, os mais comuns são: anorexia, anemia, dispepsia, perda de peso e dor abdominal ^{4,5}.

O CG é uma doença de causa multifatorial, resultando da combinação de fatores exógenos como dieta, consumo de álcool, tabagismo, infecção por microrganismos específicos, bem como também está associada a fatores endógenos, como por exemplo o acúmulo de alterações genéticas ^{5,6}. A transformação maligna das células gástricas resulta da interação de vários destes fatores ao longo de vários anos ⁷.

O padrão ouro para diagnóstico do CG é o exame endoscópico digestiva alto, com coleta de biópsia para confirmação histopatológica. O estadiamento tumoral é realizado por tomografia computadorizada das regiões do tórax, abdome e pelve, com aplicação de contraste ^{8,9}.

O adenocarcinoma gástrico (AdG) é a variação histológica mais comum e representa cerca de 95% dos casos de CG ¹⁰. Existem diferentes métodos de classificações histopatológicas, sendo que uma das mais utilizadas foi proposta por Lauren em 1965 ¹⁰, que divide os tumores nos subtipos intestinal, difuso e misto. No subtipo intestinal as células tumorais exibem adesão e estão dispostas em formações tubulares ou glandulares, enquanto que no subtipo difuso existe uma falta de adesão celular e com isso, uma maior infiltração no estroma de células únicas, ou de pequenos aglomerados celulares. Esse estroma mais rico pode estar associado a uma desregulação na via do TGF- β ^{5,11,12}.

Outra classificação histopatológica bastante utilizada é a da Organização Mundial de Saúde-OMS, que propõe uma distribuição dos tumores em quatro subtipos: tubular, papilífero, mucinoso e misto ¹³. Dados de genômica gerados pelo projeto *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) permitiram uma outra classificação em 4 grupos considerando a ocorrência de alterações moleculares: 1- subtipo com instabilidade de

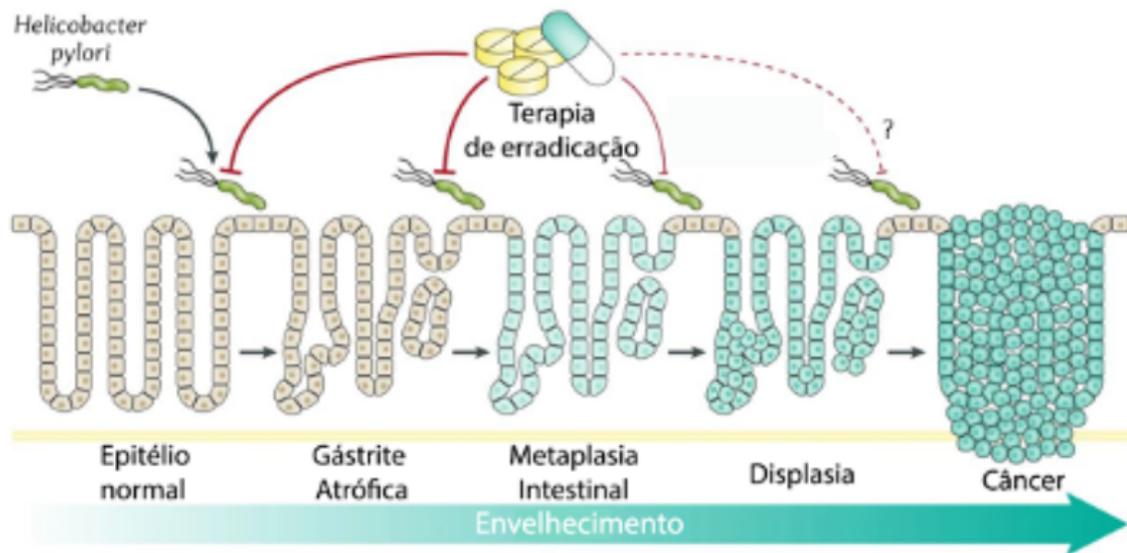
microssatélites; 2- subtipo com instabilidade cromossômica; 3- subtipo com estabilidade genômica e 4- subtipo Epstein-Barr vírus-positivo ¹⁴.

Um dos protocolos de tratamento do AdG é a quimioterapia neoadjuvante (QTneo), seguido de cirurgia, podendo esta ser uma gastrectomia parcial ou total, indicada principalmente para tumores difusos - mais propensos a disseminação ^{10,15,16}. A QTneo é adotada no protocolo de tratamento principalmente para promover a regressão tumoral, melhorando seu prognóstico. Além disso, pacientes com boa resposta à QTneo apresentam menor recorrência local e sistêmica ¹⁷. O tratamento baseado em poliquimioterapia perioperatória tem se mostrado superior quando comparado à monoterapia e atualmente o protocolo FLOT4, que compreende os quimioterápicos 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina e docetaxel, tem sido o mais utilizado, sendo também adotado no A.C. Camargo Cancer Center ¹⁸.

Um fator importante no desenvolvimento do AdG é relativo à etnia das populações. Uma coorte de 16.622 pacientes coreanos e americanos portadores de AdG e submetidos a gastrectomia nos Estados Unidos com caráter curativo, demonstrou que a sobrevida e a mortalidade dos pacientes tratados no mesmo local, pode estar relacionada com sua etnia, visto que, pacientes nascidos na Coreia, mas tratados no continente americano, têm resultados superiores do que os pacientes brancos nascidos e tratados no mesmo sistema de saúde americano¹⁹. Esses achados sugerem que fatores genéticos, ou até mesmo culturais/dietéticos, devem exercer uma considerável influência no curso natural da doença, sendo necessário considerar essa variável nos desenhos de estudos sobre o AdG.

1.2 HELICOBACTER PYLORI E O CÂNCER GÁSTRICO

Durante muitos anos perpetuou-se o dogma de que o estômago seria um órgão estéril, justificado pela alta acidez do suco gástrico. No entanto, identificou-se que a proteobactéria *Helicobacter pylori*, um bacilo gram-negativo que causa uma inflamação persistente e crônica na mucosa gástrica, pode levar ao desenvolvimento da metaplasia, condição que quando não tratada, possui grande potencial em evoluir ao longo do tempo para displasia e posteriormente para um adenocarcinoma ²⁰ (Figura 1). A malignização do tecido gástrico causado por *H. pylori* é mais comumente associada ao subtipo intestinal do AdG ²¹.



Fonte: Adaptado de Suzuki et al.²⁰

Figura 1 - Processo de carcinogênese associado a *Helicobacter pylori*. A terapia de erradicação da bactéria em diferentes graus de alteração histológica

Deste modo, desde 1994 a OMS, classifica o *H. pylori* como um agente carcinogênico do tipo I. Consequentemente a erradicação da mesma por meio de antibioticoterapia a base de claritromicina tem se mostrado eficaz, mesmo em pacientes com lesões pré-neoplásicas. Quando comparado um grupo tratado com terapia de erradicação *versus* grupo placebo, o último apresenta maior frequência de desenvolvimento de câncer gástrico ao longo dos anos (7,2% *versus* 13,9%)^{20,22}. Apesar disso, um ponto importante é que apenas cerca de 3% dos pacientes infectados com a *H.pylori* desenvolvem câncer gástrico, indicando a importância de considerarmos outros fatores que contribuem para o desenvolvimento do processo carcinogênico, visto que o câncer é uma doença complexa e multifatorial^{23,24}.

Nesse contexto, é importante compreendermos a relação da *H.pylori* com outras bactérias presentes no estômago. Durante a infecção, a microbiota gástrica é predominantemente constituída pelos filos das Proteobacterias, seguida por Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacterias, e em menor proporção das Fusobactérias^{25,26}. Muitas bactérias não sobrevivem ao pH ácido do estômago, porém, em alguns indivíduos a infecção por *H.pylori* leva a hipocloridria, dessa forma a colonização e neutralização do pH do ambiente gástrico a longo prazo pode contribuir diretamente para alterações na microbiota gástrica^{25,27}. Neste sentido, um mecanismo importante acontece na fase aguda da infecção, onde ocorre a indução da produção de citocinas, como interleucina IL-1 β , enquanto que

monócitos e neutrófilos recrutados pela produção de IL-8 na mucosa, que por sua vez foi induzida por *H. pylori*, atuam como fator inibitório de produção do ácido clorídrico^{28,29}. A longo prazo o uso de drogas inibidoras de bomba de prótons, frequentemente combinado com antibioticoterapia durante a erradicação da *H. pylori*, (ou também frequentemente usado em pacientes não infectados com a mesma, mas que possuem algum grau de alteração epitelial gástrica como a gastrite associada a sintomas como pirose), pode gerar um padrão de microbiota gástrica similar ao observado em pacientes com hipocloridria associado a gastrite atrófica³⁰. Além do estômago, essas medicações têm sido amplamente associadas com perturbação da microbiota intestinal, sendo que os pacientes que fazem seu uso podem apresentar uma menor diversidade total de microorganismos, maior predisposição à infecção por *Clostridium difficile*, diminuição de Bacteroidetes e maior abundância de Firmicutes^{30,26,31}.

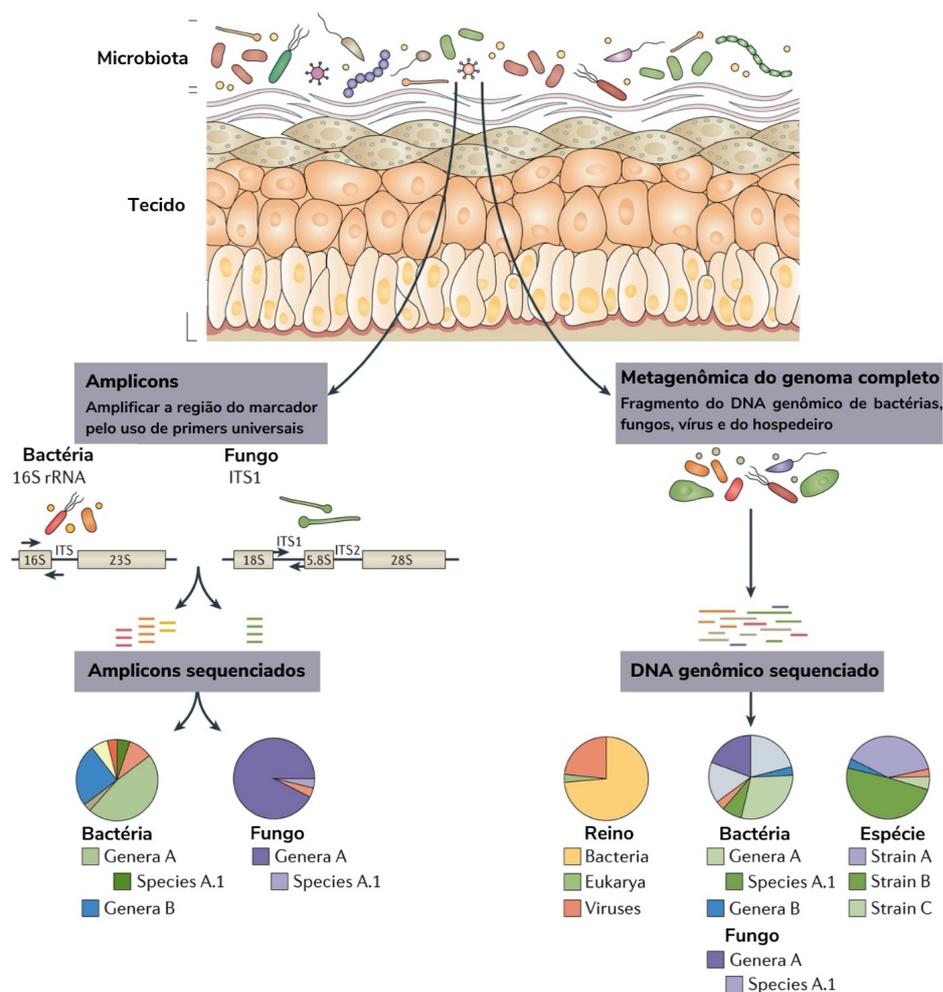
A longo prazo essas alterações podem predispor à disbiose: um desequilíbrio da comunidade microbiana que pode mudar o equilíbrio entre bactérias comensais patogênicas³². Nesse contexto, bactérias como a *Pasteurella stomatis*, *Dialister pneumosintes* e *Streptococcus anginosus* presentes na mucosa gástrica, têm sido associadas com estágios intermediários da carcinogênese. Contudo, mais estudos são necessários visto que ainda não é um consenso que diferenças na abundância de gêneros ou espécies além da *H. pylori* aumentem o risco de câncer gástrico, e se esse risco é maior diante da interação entre os microorganismos, considerando-se também fatores exógenos como a dieta.

1.3 A MICROBIOTA HUMANA

A microbiota humana é o conjunto de microorganismos - bactérias, fungos, vírus e protozoários - que habitam diversos órgãos do corpo e biofluidos, incluindo a pele, o trato respiratório, a mucosa oral, o trato gastrointestinal, entre outros. Ela representa um ecossistema que possui uma intercomunicação constante com o hospedeiro, influenciando os estados de saúde e doença^{33,34}.

O estudo da composição da microbiota é possível por meio das técnicas de metagenômica, um conjunto de métodos baseados no sequenciamento e análise bioinformática de ácidos nucleicos, que permite detectar em larga-escala e de modo independente de cultivo, uma determinada microbiota. Assim, a metagenômica é caracterizada através dos sequenciamentos genômico em larga-escala de microbiomas complexos^{35,36}.

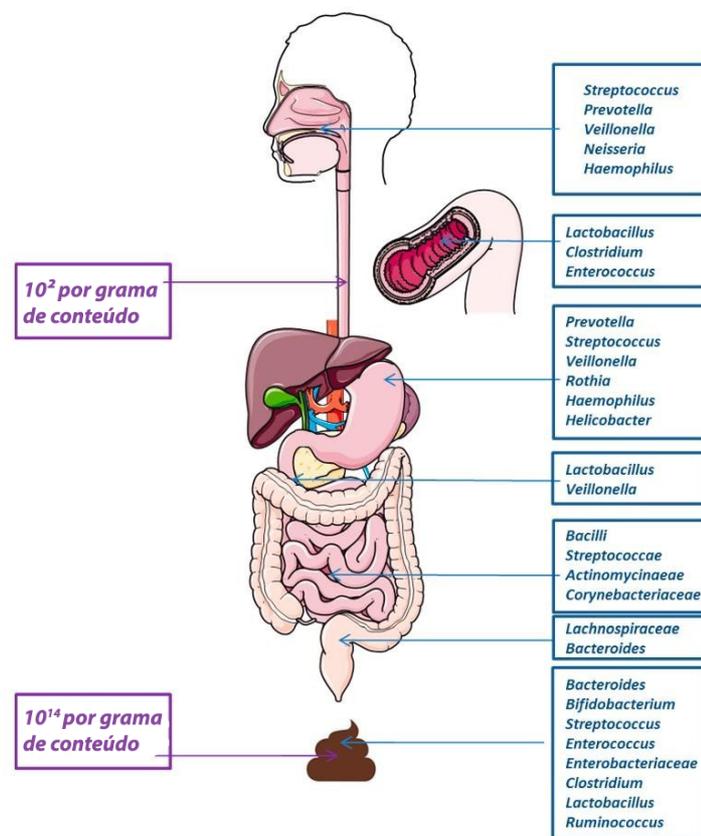
O sequenciamento do gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossomal bacteriano (rRNA) é um dos métodos mais utilizados na avaliação das bactérias presentes na amostra. A região 16S deste gene contém regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis do DNA, que sofreram diferentes pressões evolutivas e conseqüentemente, acumularam diferentes taxas de mutação. Conforme podemos observar na figura 2, a partir da amplificação de regiões hipervariáveis desse gene e seu sequenciamento e análise, é possível determinar a composição da microbiota, em geral, até o nível taxonômico de gênero^{37,38,39}. Outro método de avaliação da composição da microbiota é feito através da abordagem de “*shotgun sequencing*”, que permite o sequenciamento do DNA de todos os microrganismos presentes em determinada amostra. Este método permite ainda identificar a diversidade, abundância e a capacidade funcional da microbiota. No entanto, seu custo é significativamente mais elevado que o sequenciamento dos amplicons do gene 16S do rRNA^{40,41}.



Fonte: Adaptado de Byrd et al.⁴².

Figura 2 - Métodos de estudo da comunidade microbiana (gene 16S RNA e Shotgun).

O trato gastrointestinal abriga a maior parte dos microrganismos do nosso corpo e compreende os órgãos desde a cavidade oral até o ânus, sendo que a composição e a concentração da microbiota de cada local são variadas, indo de 10^2 a 10^{14} de bactérias/grama de matéria orgânica ⁴³ (Figura 3). Essa variação pode ser decorrente, dentre outros motivos, da quantidade de muco, do status da imunidade de mucosas e também das diferenças de pH ao longo do trato gastrointestinal, entre outros ⁴⁴. Nosso grupo relatou em 2016 a maior riqueza e diversidade microbiana associada a tecidos tumorais de pacientes com câncer de reto ⁴⁵, quando comparados a tecidos sem câncer. Recentemente, um outro estudo que avaliou a composição da microbiota fecal em pacientes com câncer colorretal, mostrou também maior riqueza de bactérias em comparação a indivíduos sem tumor ⁴⁶. Curiosamente, neste último estudo ainda foi demonstrado que tal aumento foi parcialmente provocado por bactérias originalmente presentes na cavidade oral dos pacientes com câncer, que teriam se translocado para o intestino, onde contribuíram com a tumorigênese intestinal. Nesse sentido, a passagem de bactérias vivas pelo microambiente gástrico é um dos fatores determinantes do sucesso desta translocação.



Fonte: Adaptado de Pichon; Burucoa ⁴³

Figura 3 - Composição e abundância das bactérias no trato gastrointestinal.

A microbiota intestinal possui importante ação local e sistêmica, sendo que sua interação com o sistema imune ocorre em resposta a fatores extrínsecos como a dieta, xenobióticos e patógenos. Quando em eubiose, ou seja, em equilíbrio com o corpo, esta microbiota é essencial na manutenção da integridade da barreira intestinal, o que por consequência atua regulando sua permeabilidade, evitando assim a translocação de microrganismos para a corrente sanguínea e a consequente ativação do sistema imune⁴⁷.

Já o quadro de disbiose é decorrente da perda da homeostase e tem sido associado a diversos tipos de doenças, como: inflamação intestinal, vários tipos de câncer, obesidade e até mesmo doenças autoimunes^{48,49}. Um estudo recente realizou o sequenciamento da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA em 81 amostras de mucosa gástrica incluindo indivíduos saudáveis, com metaplasia (condição potencialmente pré-maligna) e câncer gástrico, buscando estudar uma possível disbiose durante os estágios da progressão neoplásica. Interessantemente foi encontrado um grau de disbiose significativo não só nos pacientes com câncer gástrico, mas também naqueles com metaplasia, o que poderia indicar uma possível contribuição do estado disbiótico para o desenvolvimento do câncer^{32,50}.

1.4 OCIDENTALIZAÇÃO DA DIETA E SEU IMPACTO NA MICROBIOTA

O perfil alimentar é distinto entre países industrializados e não industrializados, com importante discrepância na qualidade e a quantidade dos alimentos ingeridos. Evidências sugerem que a dieta pode atuar de maneira importante no processo da carcinogênese, tanto na promoção quanto na inibição da progressão tumoral, bem como promovendo desequilíbrios nas populações microbianas, levando à disbiose^{51,52}.

Alguns perfis de dieta estão mais associados com a disbiose, como é o caso da dieta ocidental, que tem por características uma baixa ingestão de fibras e elevada quantidade de açúcares e gorduras, decorrente da contribuição dos alimentos ultraprocessados^{33,34}. A NOVA classificação de alimentos, criada por Monteiro et al.^{53,54}, define os grupos alimentares de acordo com a natureza, extensão e a finalidade do processamento industrial que lhes é aplicado, envolvendo técnicas físicas, biológicas e químicas utilizadas após a separação dos alimentos da natureza e antes de serem consumidos ou transformados em pratos e refeições. Em 2014 essa classificação foi incorporada no Guia Alimentar da População Brasileira⁵⁶, que considera que o processamento empregado na produção dos alimentos condiciona o perfil de nutrientes e o sabor que agrega à alimentação, além de influenciar com quais outros alimentos serão consumidos, em que circunstâncias (quando, onde, com quem) e mesmo em que

quantidade. Atualmente é necessária uma atenção especial ao processamento para compreender a conexão entre a dieta e a saúde pública, visto que as classificações convencionais de alimentos, as quais agrupam alimentos e gêneros alimentícios em termos de sua origem, fazendo com que tenhamos alimentos que quando consumidos juntos possuem diferentes efeitos biológicos ⁵⁷. Um exemplo prático é o agrupamento entre grãos inteiros junto com cereais matinais açucarados, ou frango fresco com *nuggets*.

Considerando isso, a NOVA classifica os alimentos em: *in natura* e minimamente processados, ingredientes culinários processados, alimentos processados e ultraprocessados; sendo que atualmente existem mais de 80 estudos em diferentes países que utilizam essa classificação ⁵⁷. De acordo com a 2ª edição do Guia Alimentar da População Brasileira ⁵⁶ e o relatório de 2019 da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura ⁵⁵, os alimentos *in natura* e minimamente processados se caracterizam por serem alimentos naturais, alterados por métodos que incluem a remoção de partes não comestíveis ou indesejadas e também processos que incluem secagem, trituração, moagem, pulverização, fracionamento, pasteurização ou similares. Já os ingredientes culinários processados são substâncias como açúcar, sal e óleos, derivados do primeiro grupo, que sofrem processos de prensagem, refino e outros métodos que visam gerar produtos duráveis para uso culinário. Embora esses ingredientes sejam muitas vezes desequilibrados em termos de nutrientes, geralmente eles não são consumidos sozinhos, mas sim adicionados a alguma preparação culinária. Já os alimentos processados tem dois ou três ingredientes e são reconhecidos como versões modificadas de alimentos do grupo 1. Eles geralmente são produzidos para serem consumidos como parte de refeições ou pratos, podendo também ser consumidos sozinhos como aperitivos, sendo que a maioria é altamente palatável. Já os ultraprocessados, são formulações de ingredientes, feitos em geral por indústrias de grande porte, envolvendo diversas etapas e técnicas de processamento e muitos ingredientes, incluindo sal, açúcar, óleos e gorduras e substâncias de uso exclusivamente industrial. Esse último grupo tem sido extensivamente associado em grandes estudos populacionais ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, o diabetes, e o câncer ^{57,58,59}.

Tendo em vista esses conceitos, é de extrema importância compreender que a microbiota é dinâmica e se adapta a influências ambientais, sejam elas mais associadas com saúde, ou com doenças ⁶¹. Alguns dados sugerem que a microbiota das sociedades industrializadas difere substancialmente da microbiota ancestral dos humanos, gerando um perfil de microorganismos compatível com influências dietéticas e outros aspectos exógenos, porém incompatível com a biologia humana e com perfil talvez inadequado para certas

atividades da comunidade eubiótica tais como redução de alergias e ativação adequada do sistema imune ^{33,61}. Isso se dá, pelo fato de que ao longo da evolução e industrialização, as sociedades mudaram a dieta, com maior abundância na densidade calórica e alimentos altamente processados e pobres em nutrientes, que geram grande impacto na ingestão calórica total, além do acréscimo de produtos químicos não alimentares, incluindo conservantes, pesticidas, aditivos e emulsificantes ^{33,62,63,64}. Ao mesmo tempo em que é crescente esse perfil alimentar desequilibrado, ocorre uma diminuição dos carboidratos acessíveis à microbiota (CAMs), que são fibras prebióticas, encontradas principalmente em frutas, hortaliças, grãos e cereais integrais ^{33,65}, gerando então a síndrome da microbiota insuficiente, descrita como a perda de alguns microorganismos e de suas funções associadas, que foram parte de nosso passado ancestral em uma época menos industrializada, onde as dietas eram ricas em CAMs ³³.

Já é sabido que este perfil de microbiota é diferente quando se compara indivíduos de regiões rurais com aqueles provenientes de regiões urbanas, e que esta diferença está associada tanto com questões geográficas, quanto com hábitos de vida ^{66,67,68,69}. Corroborando isso, um trabalho brasileiro recente avaliou a contribuição calórica dos alimentos segundo a NOVA classificação de alimentos, de agricultores adultos da região sudeste. Eles evidenciaram uma ingestão predominante de 64,7% dos alimentos *in natura* e minimamente processados nas regiões rurais, mostrando que a depender da área rural, ainda é predominante um perfil que preserva uma dieta mais balanceada ⁷¹.

A nível experimental um estudo recente mostrou que camundongos alimentados por 8 semanas com uma dieta composta pelo padrão ocidental, versus uma ração balanceada, levou ao desenvolvimento de disbiose no primeiro grupo, causando um aumento da taxa de translocação de microrganismos e, por consequência, o desenvolvimento de inflamação sistêmica ⁷². Dessa forma, existem indícios que esta dieta está associada com a progressiva depleção da camada de muco do cólon, que é constituído principalmente de glicoproteínas denominadas mucinas. No intestino grosso o muco é responsável por formar uma dupla camada, sendo a camada mais interna presa ao epitélio e impenetrável às bactérias, enquanto que a camada mais externa é o habitat de várias bactérias comensais ⁷³. Pode-se então classificar a camada interna como uma barreira física, que protege o hospedeiro da translocação de bactérias do intestino para outros tecidos e para a corrente sanguínea ^{74,75}.

Neste mesmo contexto do impacto da dieta ocidental, Vangay et al. ⁷⁶ avaliaram a composição das eubactérias presentes na microbiota fecal através do sequenciamento do gene 16S rRNA e shotgun de 514 asiáticos residentes na Tailândia, ou nos Estados Unidos.

Também foram coletados seus dados antropométricos e o recordatório alimentar de 24 horas. Os autores descreveram que a imigração dos indivíduos de países não-ocidentais como a Tailândia, para um país com predominância da dieta típica ocidental, associou-se com uma profunda perturbação da microbiota intestinal, com perda de cepas de bactérias nativas e a consequente diminuição da capacidade de degradação das fibras alimentares em decorrência da alteração entre as proporções das cepas de *Prevotella* e *Bacteroidetes*. Um ponto de atenção é que os *Bacteroidetes* estavam mais abundantes em indivíduos com dieta típica ocidental, rica em proteínas e gorduras, enquanto a *Prevotella* mais abundante em indivíduos com dieta predominante em carboidratos e fibras. Alterações nas proporções entre estes filos levaram a uma menor produção da enzima glucanase e de outras hidrolases glicosídicas, impactando diretamente na capacidade de degradação das fibras pelas bactérias comensais.

Um outro trabalho analisou ainda dados dietéticos entre adultos com 25 anos ou mais em 195 países, buscando estimar o efeito de cada uma destas variáveis na mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Foi possível observar que os fatores dietéticos afetam os indivíduos independente do sexo e outras variáveis socioeconômicas, sendo que a baixa ingestão de grãos integrais e frutas – as principais fontes de fibras, vitaminas e minerais – são um dos principais contribuintes para a mortalidade pelas DCNT ⁷⁷.

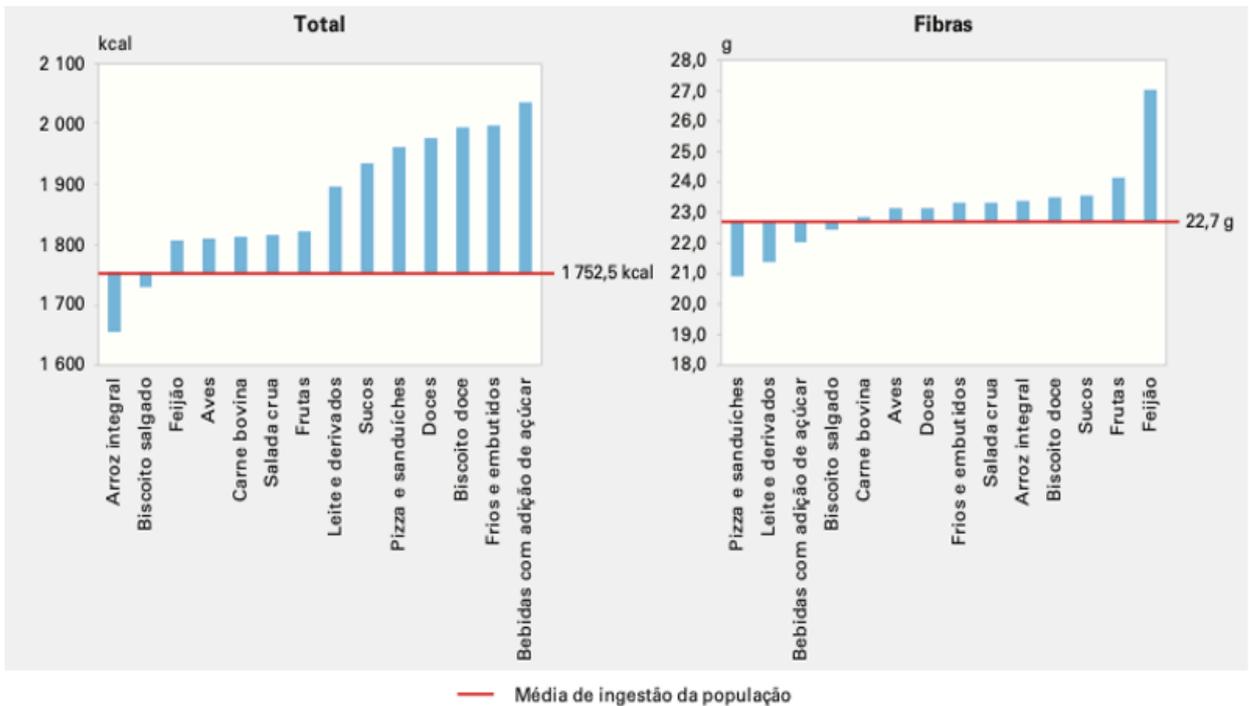
Sabendo que as fibras atuam como substratos exclusivos de degradação por algumas bactérias presentes no lúmen intestinal, a influência da dieta tem sido extensivamente investigada com o intuito de determinar a sua capacidade de modulação da microbiota intestinal, tanto de forma aguda, quanto crônica, bem como o impacto do seu consumo no desenvolvimento de doenças ⁷⁸.

1.5 FIBRAS ALIMENTARES E MICROBIOTA GÁSTRICA

As fibras alimentares exercem efeitos protetores e parecem ter papel auxiliar na diminuição da ocorrência de alguns tipos de câncer, como o colorretal; efeito este aparentemente gerado em consequência da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) através da digestão das mesmas por bactérias comensais ^{79,80}.

A ingestão recomendada pela *Dietary Reference Intakes* (DRI), elaborada pelo *The Institute of Medicine* (IOM), é de 14g de fibras para cada 1000 Kcal ingerida, totalizando uma média de 25g para mulheres adultas e 38g para homens adultos ⁸¹. No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) publicada em 2020, que foi realizada entre 2017 e 2018, constatou que a ingestão média de fibras pela população brasileira era de 22,7 g/dia, um

consumo abaixo de qualquer recomendação descrita na literatura. Os indivíduos que relataram o consumo de pizza e sanduíches, leite e derivados, bebidas com adição de açúcar, e biscoito salgado, apresentaram médias de ingestão de fibras abaixo da média populacional, além de apresentarem uma ingestão energética pelo menos 10% acima da média populacional (Figura 4)⁸².



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE²

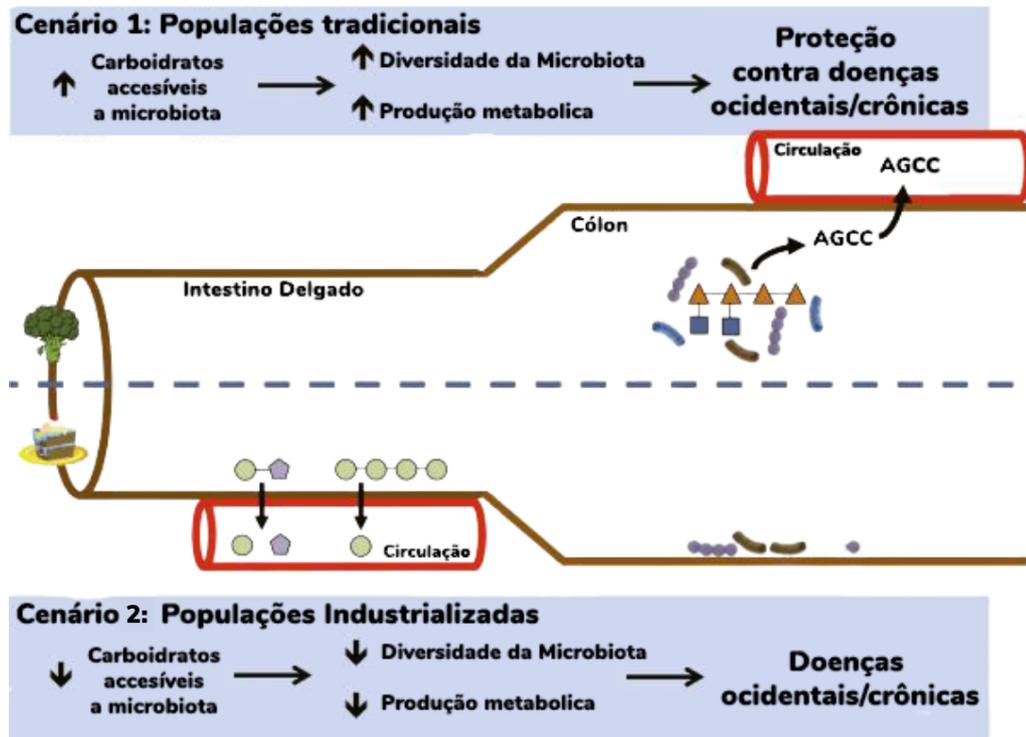
Figura 4 - Médias de ingestão de energia total e fibras dos grupos de pessoas que consomem os alimentos selecionados. Comparação com as médias de ingestão de energia total e fibras da população Brasileira - no período de 2017-2018.

As fibras possuem ação fisiológica distinta devido aos diferentes graus de solubilidade e fermentação, sendo classificadas em dois subtipos: solúveis e insolúveis⁸³. As fibras solúveis atuam diminuindo a velocidade do esvaziamento gástrico, promovendo maior saciedade e aumento no tempo do trânsito intestinal, quando são fermentadas pelas bactérias comensais do intestino grosso. Nesse subtipo temos por exemplo a inulina, um amido resistente à digestão, a beta-glucana e o frutooligosacarídeo. Já as fibras insolúveis como a celulose e lignina atuam na redução do trânsito intestinal, no aumento do bolo fecal e são pouco fermentadas^{83,84,85}.

A nível do intestino grosso as fibras solúveis tem ação prebiótica, ou seja, são utilizadas como substrato pelas bactérias comensais que por meio de um processo de

fermentação sacarolítica anaeróbica geram os AGCC, entre eles o acetato, propionato e butirato ^{46,78}. sendo que o butirato é dos metabólitos mais estudados, tanto em modelos animais quanto em humanos. Recentemente, um trabalho realizado em camundongos com câncer colorretal comparou uma ração padrão, versus uma dieta rica em fibras insolúveis por um período de 12 semanas. Curiosamente, os autores observaram que o grupo alimentado com fibras insolúveis teve um aumento de *Bifidobacterias*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal – sendo que todas as bactérias destes gêneros são produtoras de AGCC ⁸⁰. Esses achados reforçam o fato de que apesar das fibras insolúveis serem fermentadas pelas bactérias comensais em menores proporções em comparação às solúveis, os produtos resultantes ainda são capazes de produzir efeitos significativos na composição da microbiota ⁸³. Os AGCC, em especial o butirato, tem sido associado à modulação da resposta imune, principalmente em células epiteliais do cólon. Os efeitos de alguns deles são mediados por ligação a receptores acoplados a proteína G, frequentemente expressos em células do sistema imune⁸⁸. Sua ação parece ser essencial na regulação do processo inflamatório, podendo estimular ou atenuar a produção de citocinas. Esse processo ocorre pela modulação da ativação do fator de transcrição NF-κB, que gera um aumento da produção da interleucina 10 (IL-10), e inibe a produção de moléculas pró-inflamatórias, como a IL-12, TNF-α e IL-1β ⁸⁹.

É importante ressaltar que grande parte da celulose e outras fibras insolúveis que os humanos consomem não são totalmente metabolizadas pelas bactérias intestinais, dessa forma não são classificadas como carboidratos acessíveis à microbiota (CAMs) (Figura 5). Portanto, além de ser necessário considerar as características do carboidrato, também é necessário compreender a individualidade do hospedeiro, visto que suas características genóticas podem influenciar na fermentação dos CAMs ^{88,89,90}.



Fonte: Adaptado de Sonnenburg; Sonnenburg⁹⁰

Figura 5 - Os cenários metabólicos divergentes de uma dieta rica em carboidratos acessíveis a microbiota (CAMs) *versus* uma dieta pobre em CAMs. **Nota:** No primeiro cenário, uma dieta rica em CAM com poucos açúcares simples, a principal contribuição dos carboidratos para o metabolismo do hospedeiro está na forma de produtos finais da fermentação de AGCC da microbiota que desempenham diversos papéis regulatórios na fisiologia humana. No segundo cenário, a dieta ocidental de baixo CAMs resulta não apenas na perda de metabólitos microbianos benéficos, como os AGCC, mas também na seleção de um microbiota distinta, que pode parecer estranha ao hospedeiro. O aumento da representação de micróbios que utilizam o muco como fonte de alimento, leva a diminuição da motilidade intestinal e o aumento das calorias na forma de açúcar e gordura, que podem contribuir no desenvolvimento de doenças ocidentais.

Com base nestes dados, é crescente o interesse pela ação das fibras alimentares nos mais diversos contextos. Neste sentido, uma pesquisa clínica em andamento desenvolvida pelo grupo da Dr. Jennifer Wargo (*MD Anderson Cancer Center e Parker Institute for Cancer Immunotherapy*) e apresentada no encontro da *American Association for Cancer Research (AACR)* em 2019⁹³, mostrou que pacientes com melanoma metastático tratados com anti-PDL1 que se alimentavam com uma dieta rica em fibras tiveram uma maior diversidade da microbiota intestinal e 5 vezes mais chances de responder ao tratamento. Paralelamente, pacientes que fizeram uso de probióticos por conta própria tiveram uma pior resposta ao tratamento e redução da diversidade de sua microbiota fecal.

Esses dados são de extrema importância ao demonstrar que intervenções na dieta dos pacientes - com o uso de fibras prebióticas ou o consumo de probióticos - pode alterar

significativamente a resposta ao tratamento imunoterápico. Neste sentido, vários estudos clínicos estão abertos em diversos países avaliando o impacto do uso de probióticos específicos, combinados ou não a prebióticos, e intervenções nas dietas dos pacientes durante os tratamentos quimioterápico e imunoterápico ⁴⁷.

Com o intuito de avaliar ainda mais a influência do consumo de fibras na composição da microbiota, Nobel et al. ⁹⁴ investigaram por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e da análise de questionários de frequência alimentar, a associação da ingestão de fibras com a microbiota esofágica de 47 pacientes ambulatoriais. Partindo de um consumo médio de fibras de 16g, conforme a ingestão de fibras foi aumentada, foi observada uma associação positiva com a abundância relativa de Firmicutes e a diminuição de bactérias gram-negativas em geral. Esses resultados demonstram que a ingestão aumentada de fibras está associada a um microbioma significativamente distinto do observado em indivíduos com menor ingestão das mesmas.

Tendo em mente os inúmeros benefícios e efeitos sistêmicos da ingestão de fibras alimentares, Desai et al., 2016⁹⁵ procuraram compreender os mecanismos pelos quais a privação de fibras afeta a microbiota intestinal e altera o risco de aparecimento de doenças. Foi utilizado um modelo de camundongo gnotobiótico, ou seja, livres de germes, os quais tiveram o intestino colonizado com microbiota intestinal humana sintética contendo 14 espécies bacterianas. O grupo com dieta rica em fibra foi alimentado com uma ração contendo 15% de fibras dietéticas provenientes de ingredientes alimentares como grãos e plantas minimamente processados, já o segundo grupo recebeu uma ração com 0% de fibras, onde o amido e a maltodextrina foi substituída por glicose. Eles evidenciaram que durante a escassez crônica ou intermitente de fibra alimentar, a microbiota utiliza como fontes de energia as glicoproteínas presentes na barreira de muco, levando a degradação da mesma, que se tornou permeável. Essa degradação se dá devido ao aumento da população de um sub-grupo de bactérias degradadoras de mucina e expressão da enzima CAZimas, que utiliza as mucinas como fonte de nutrientes.

Um ponto importante é que os alimentos são considerados matrizes alimentares complexas, fazendo com que a dieta seja composta por alimentos que possuem não apenas nutrientes, mas outros componentes alimentares que não fornecem energia ⁹⁶. Dessa forma o efeito benéfico de alguns alimentos como as frutas, vegetais, grãos integrais e outros alimentos a base de plantas têm sido atribuído principalmente ao sinergismo, ou interação entre os compostos bioativos e nutrientes ^{96,97,98}. Nesse contexto, as fibras alimentares parecem ter um efeito sinérgico com os polifenóis e outros compostos fenólicos, visto que

ambos estão presentes em alimentos *in natura* e minimamente processados, sendo que durante a digestão gastrointestinal as fibras dietéticas podem interagir e se ligar aos antioxidantes presentes na matriz alimentar por meio de ligações de hidrogênio, interações covalentes ou aprisionamento físico-químico realizado pela fibra alimentar^{97,98,99}. Dessa forma a nível do intestino grosso, a microbiota é responsável por fermentar essa matriz de fibras e antioxidantes, fazendo com que esses compostos fenólicos sejam gradualmente liberados no lúmen intestinal e parcialmente absorvidos, gerando assim efeitos sistêmicos. Um ponto interessante é que os compostos não fermentados e conseqüentemente não absorvidos, permanecem no lúmen e participam da neutralização de radicais livres, amenizando assim o efeito pró-oxidante de alguns contribuintes dietéticos^{82,97,100,101}. Ao mesmo tempo temos toda a fermentação das fibras dietéticas acontecendo e gerando seus metabólitos, conforme descrito anteriormente. Podemos então notar que muito além das fibras, também é importante considerar o alimento e toda a dieta, por conta da alta complexidade entre suas interações.

Desta forma, apesar do estômago ser um órgão colonizado por bactérias, pouco se sabe sobre a inter-relação entre a dieta e principalmente a ingestão de fibras alimentares e sua ação sobre o microbiota gástrica de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico (AdG), visto que os estudos se limitam principalmente a análises a da microbiota intestinal, avaliada na maioria dos casos através das fezes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis correlações entre a microbiota bacteriana gástrica de pacientes com adenocarcinoma gástrico e controles sem câncer, e a ingestão de fibras totais, solúveis e insolúveis presentes na dieta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de dieta segundo o grau de processamento dos alimentos e a associação com o conteúdo de fibras alimentares na dieta de pacientes com AdG e controles sem câncer, a partir do histórico alimentar de 1 ano precedente;
- Avaliar as diferenças na dieta que segregam pacientes com AdG e controles sem câncer;
- Buscar associações entre o consumo de fibras alimentares e a composição da microbiota do lavado gástrico em pacientes com AdG e controles sem câncer;
- Avaliar a existência de diferenças na composição da microbiota de pacientes com AdG com os subtipos histológicos de Lauren: intestinal, difuso e misto;
- Avaliar a existência de diferenças na microbiota de pacientes com AdG com localizações tumorais distintas: cárdia, corpo, fundo, antro e piloro
- Avaliar se os grupos com maior e menor ingestão de fibras diferem em termos de sobrevida global ou doença específica.

3 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto é afiliado ao projeto temático financiado pela FAPESP: 2014/26897-0 “Genômica de Adenocarcinomas Gástricos”, em andamento no Laboratório de Genômica Médica do A.C.Camargo Cancer Center, sob coordenação de Emmanuel Dias-Neto, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desse mesmo centro sob o número 2134/15 (Anexo 1 e 2). As coletas de informações da dieta, assim como as análises da microbiota, foram previamente previstas e aprovadas dentro do projeto citado. Deste modo as amostras biológicas analisadas aqui foram provenientes de pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 3 ao 5), relacionado a este projeto temático e previamente aprovado pelo CEP institucional. Todos os pacientes foram informados do objetivo da pesquisa e convidados a participarem de modo voluntário.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRAS

A população de estudo foi constituída por 206 pacientes com diagnóstico histopatológico de AdG, com idade entre 25 e 85 anos, recrutados entre fevereiro de 2018 a fevereiro de 2020. Todos os pacientes foram diagnosticados, ou tiveram seu diagnóstico confirmado no A.C.Camargo Cancer Center, além de terem sido também tratados nesta mesma instituição.

No grupo controle de pacientes sem câncer foram recrutados 181 indivíduos, sendo que as coletas de material biológico foram feitas no momento em que eles estavam sendo submetidos a endoscopia gástrica investigativa. Mesmo sendo um grupo com queixas gástricas, esses pacientes não tiveram diagnóstico de neoplasia gástrica.

Foram incluídos também 385 controles sem diagnóstico de câncer e sem queixas de distúrbios gástricos, provenientes da campanha de prevenção do A.C.Camargo Cancer Center, que atendeu mais de 40 mil pessoas/ano e que não tiveram neoplasias diagnosticadas nos exames da campanha. Esse grupo foi recrutado anteriormente - entre abril de 2016 e abril de 2019 - por entrevistadores treinados, vinculados a este projeto temático. Vale ressaltar que a

coleta de material biológico não estava prevista, pois estes não tinham indicação médica de endoscopia digestiva alta, e deste modo obtivemos apenas dados clínicos e alimentares deste grupo.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DOS CASOS

- Pacientes com diagnóstico histopatológico de AdG, codificado conforme a “Classificação Internacional de Doenças” em oncologia. (CIDO3) ¹⁰⁴ Topografia C16 (CID 10);
- Pacientes que não fizeram uso de antibióticos nos últimos 30 dias;
- Pacientes que tiverem assinado o Termo de consentimento livre e esclarecido.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE CONTROLES ENDOSCÓPICOS

- Indivíduos submetidos à endoscopia digestiva alta, com diagnóstico negativo para neoplasia gástrica, com idade acima de 18 anos.
- Indivíduos que não fizeram uso de antibióticos nos últimos 30 dias;
- Indivíduos que tiverem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DOS CONTROLES DA CAMPANHA DE PREVENÇÃO

- Indivíduos com diagnóstico negativo para neoplasia gástrica confirmada em exames realizados na campanha de prevenção do A.C.Camargo Cancer Center, com idade acima de 18 anos.
- Pacientes que não fizeram uso de antibióticos nos últimos 30 dias;

3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE CASOS E CONTROLES

- Indivíduos que recusaram, ou não apresentaram condições físicas ou mentais para participar da pesquisa;
- Indivíduos com diagnóstico prévio de câncer;

3.7 MÉTODOS

3.7.1 Amostras Biológicas e Processamento

Amostras de lavados gástricos foram coletadas durante a rotina endoscópica realizada no exame inicial do paciente e antes da realização de qualquer tipo de tratamento oncológico. Esse fluido compreende o suco gástrico e a água mineral utilizada para lavar o estomago durante o exame, quando é o caso. Os pacientes receberam instruções de preparo para o exame, que incluíram jejum de líquido e sólido por pelo menos seis horas. Os fluidos gástricos foram imediatamente processados após a coleta, incluindo mensuração de volume e neutralização do pH, e mantidos a -20°C até seu uso. Estas amostras de lavados tiveram volumes variáveis (geralmente de 3 até 50ml), pois é comum ser necessária uma lavagem da cavidade gástrica com água mineral, no momento da endoscopia para melhor visualização de lesões. Assim, o volume da água se soma ao volume total do suco gástrico. Normalmente estas amostras de lavado seriam descartadas após o procedimento endoscópico.

3.7.2 Extração de Ácidos Nucleicos (DNA)

Para a extração de DNA das amostras de fluidos gástricos, 500 μl do material coletado foram incubados por 3h em agitação (300 rpm) com 500 μl do reagente de digestão *Cell Lysis Solution* (Qiagen) em temperatura ambiente e 30 μl de proteinase K a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir deste ponto foi feita a extração de DNA utilizado fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:1 (Merck), que consistiu em:

- 1 Adicionar 500 μl do reagente de digestão. Homogeneizar por inversão 1minuto. Centrifugar por 10 min a 13.200 rpm, em temperatura ambiente;
- 2 Transferir a fase aquosa para um novo tubo. Adicionar novamente 500 μl do reagente.
- 3 Homogeneizar por inversão por 1min. Centrifugar por 10min a 13.200 rpm em temperatura ambiente;
- 4 Adicionar 500 μl de clorofórmio e homogeneizar por inversão por 1min. Centrifugar por 10 min a 13.200 rpm, em temperatura ambiente;
- 5 Transferir a fase aquosa para um novo tubo. Adicionar 800 μl de álcool etílico 100% gelado + 80 μl de acetato de sódio (3M). Incubar por 1h a -20°C ;
- 6 Centrifugar por 30 min a 14.000 rpm, a 4°C . Remover e descartar o sobrenadante;
- 7 Adicionar 1ml de álcool etílico 70% gelado para lavagem do pellet;

- 8 Centrifugar por 5min a 14.000 rpm, a 4°C. Remover e descartar o sobrenadante;
- 9 Adicionar novamente 1ml de álcool 70% gelado;
- 10 Centrifugar por 5min a 14.000 rpm, a 4°C. Remover e descartar o sobrenadante;
- 11 Secar o pellet a 42°C;
- 12 Ressuspender o pellet em 100 ul de água ultrapura (Sigma);
- 13 Incubar a 55°C por 10min e em seguida quantificar o DNA.

Após as extrações, todas as amostras foram quantificadas através do equipamento Qubit (Thermo Fisher).

3.7.3 Análises de Bactérias da Microbiota por Avaliação do Gene 16s do RNA Ribossomal

As amostras de DNA obtidas a partir da extração dos lavados gástricos foram amplificadas por PCR convencional, tendo como alvo as regiões V3- V4 do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) bacteriano. Padronizamos a massa de DNA de 50ng como molde de amplificação. Como já estabelecido no laboratório, quando uma amostra não era amplificada com a massa padrão, na PCR seguinte eram utilizados o dobro de massa e a metade, para recuperar respectivamente as amostras não amplificadas devido a escassez de DNA bacteriano, ou a presença de inibidores da reação de amplificação.

Os iniciadores utilizados para amplificação possuem adaptadores (sublinhados na sequencia abaixo) adequados para sequenciamento na plataforma Illumina e geram amplicons com tamanho médio final de cerca de 500 pares de bases (U341F: 5' CACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGGGRSGCAGCAG 3' e 806R: 5'GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT 3')¹⁰⁶. A enzima KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2X (Kapa Biosystems) foi selecionada para amplificação de DNA. A reação final e condições estabelecidas são apresentadas nas tabelas 1 e 2. Como controles utilizamos DNA de *Escherichia coli* (controle positivo) e água ultrapura (Sigma) como controle negativo.

Tabela 1 - Condições de amplificação do gene 16S (regiões V3-V4) utilizadas neste estudo.

Reação	Volume (µL)
Primer U341F (5uM)	3,5
Primer 806R (5uM)	3,5
Kapa Hifi Hotstart	17,5
Amostra + H2O	10,5
Volume final	35

Tabela 2 - Condições de termociclagem para amplificação do gene 16S (regiões V3-V4) utilizadas neste estudo.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclo(s)
Desnaturação inicial	95°C	2min	1x
Desnaturação	95°C	20s	28x
Anelamento	54°C	15s	
Extensão final	72°C	5min	1x

Os amplicons gerados foram purificados com *beads* magnéticas (AMPure XP - Beckman Coulter), quantificados no Qubit (ThermoFisher) e sequenciados em serviço terceirizado (Neopropecta Microbiome Technologies - Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) que realizou a construção das bibliotecas e sequenciamento de acordo com protocolo estabelecido por eles. Para a construção de cada biblioteca uma nova amplificação foi realizada em triplicata usando:- 5 ng de amplicon purificado por reação; a enzima Taq Platinum (Invitrogen) e barcodes específicos para cada amostra (condições da amplificação: 95°C por 5 min, seguindo de 10 ciclos de 95°C por 46s, 66°C por 30s e 72°C por 45s, e uma extensão final de 72°C por 2min). As triplicatas foram associadas e purificadas com o Ampure XP Beads (Beckman Coulter), e em seguida foi fdoeito o *pool* das bibliotecas usando volume iguais de cada amostra ¹⁰⁵. A quantificação do *pool* foi feita por qPCR com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems). Para o sequenciamento foi utilizado o kit MiSeq Reagent v2 (500 ciclos) na plataforma MiSeq (Illumina), visando gerar ≥ 50.000 *reads* por amostra.

3.7.4 Processamento e Filtragem das Amostras Sequenciadas

Após o sequenciamento os dados foram processados pelo Núcleo de Biologia Computacional do A.C.Camargo Cancer Center, após estruturação do *pipeline* em conjunto com nosso grupo do Laboratório de Genômica Médica. O processamento seguiu os seguintes passos: (1) remoção dos adaptadores; (2) remoção das *reads* mapeadas no genoma humano; (3) importação das *reads* restantes para o programa Qiime2¹⁰⁶; (4) realização da junção dos *reads* pareados e aplicação do filtro de qualidade; (5) controle de qualidade para remoção de ruídos das *reads* através do Deblur¹⁰⁷. As sequências foram então clusterizadas como *Operational Taxonomic Units* (OTUs), quando apresentavam 97% de similaridade entre elas. Sendo que cada OTU foi analisada contra sequências do banco de dados SILVA¹⁰⁸, visando assim sua classificação taxonômica. Um *cluster* de sequências foi considerado uma OTU quando apresentou uma identidade taxonômica similar de no mínimo 80%, podendo atingir até 100%, com valor de p mínimo de 0,001.

Após a aplicação destes filtros, foram feitas curvas de saturação para observar se toda a variabilidade das OTUs amplificada em cada amostra foi devidamente avaliada e contabilizada. Porém, antes de serem analisadas foram descartadas OTUs compostas de menos de 3 sequências e também removemos as amostras que não apresentaram no mínimo 1000 *reads* após aplicação desses filtros, de modo a excluir amostras não analisadas em profundidade suficiente. Essa padronização já tinha sido utilizada em outros estudos de nosso grupo.

3.7.5 Caracterização de Hábitos de Vida e Perfil Alimentar

Questionários estruturados foram aplicados aos indivíduos dos grupos caso e controles endoscópicos e da campanha de prevenção, incluindo questões sobre estilo de vida, histórico médico pessoal e familiar, histórico de consumo de álcool e tabaco, consumo de medicamentos e hábitos alimentares que incluem mais de 120 itens. Estes questionários foram adaptados de um outro questionário já validado em um estudo anterior aplicado no A.C.Camargo Cancer Center, em pacientes portadores de câncer colorretal¹⁰⁹. O questionário alimentar também foi previamente utilizado em outros estudos já publicados^{103,104}. Também foram coletados dados sobre: o consumo de medicamentos, com ênfase naqueles relacionados ao pH gástrico, como antiácidos, inibidores de bombas de prótons ou inibidores de histamina-H₂, além de anti-inflamatórios.

O questionário de frequência alimentar (QFA) utilizado segue uma estrutura padrão de perguntas para cada tipo de alimento e sua preparação, permitindo que o sujeito relate seu

consumo em unidades de tempo (dia, semana, mês, ano), conforme a **Tabela 3**. Para otimizar a padronização das análises, foi realizada a conversão desses dados para uma única unidade de medida de tempo com base na Pesquisa de Orçamentos Familiares ⁸², que analisou o consumo alimentar habitual no Brasil em gramas por dia, conforme Tabela 4.

Tabela 3 - Estrutura racional do questionário de frequência alimentar.

Grupo de Alimentos	Com que frequência você costuma comer?		Qual o tamanho da sua porção?	
Alimentos e Preparações	Quantas vezes você come:	Unidade de tempo:	Sua porção (medida caseira)	Porção em gramas
	Número de vezes: 1, 2, 3 etc. (N=Nunca ou raramente comeu no último ano)	D = por dia S = por semana M = por mês A = por ano	P= porção pequena M = porção média G = porção grande	Para cada porção em medida caseira, temos uma porção convertida em gramas do alimento

Fonte: Adaptado de Lameza ¹⁰⁹

Tabela 4 - Racional para padronização do consumo alimentar diário

Resposta (Unidade de tempo)	Unidade de tempo em dias	Racional
Dia	1	Quantidade de vezes consumida no dia X quantidade da porção em gramas / unidade de tempo
Semana	7	Quantidade de vezes consumida na semana X quantidade da porção em gramas / unidade de tempo
Mês	30	Quantidade de vezes consumida no mês X quantidade da porção em gramas / unidade de tempo
Ano	365	Quantidade de vezes consumida no ano X quantidade da porção em gramas / unidade de tempo

Os alimentos foram categorizados segundo seu grau de processamento, classificação proposta por Monteiro et al. ⁵⁴ e incorporada pela segunda edição do Guia Alimentar da População Brasileira ⁵⁶.

Com base na ingestão alimentar em gramas/dia calculamos a contribuição calórica para cada alimento/preparação e também a contribuição de fibras totais, solúveis e insolúveis a partir de um banco de dados integrado, que contempla a composição centesimal padronizada em 100g do alimento. Para construção do banco foi utilizada a Tabela de Composição dos Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil ¹¹², complementada quando necessário com a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos da UNICAMP ¹¹³ e a Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional ¹¹⁴.

Após a obtenção do valor calórico bruto de cada questionário de frequência alimentar foi realizada a exclusão de 22 sujeitos/*outliers*, com base na alta ingestão energética (acima de

5200 kcal, que variou dentro para cada faixa etária) de acordo com a metodologia de Nielsen ¹¹⁵, com objetivo assim de controlar o viés de possíveis erros e superestimação que os questionários e a limitação humana podem gerar. Essa metodologia tem sido utilizada em estudos publicados recentemente ¹¹⁶. Dentre os casos excluídos, foram: 12 casos, 4 controles endoscópicos e 6 controles da campanha de prevenção (**Figura 6**).

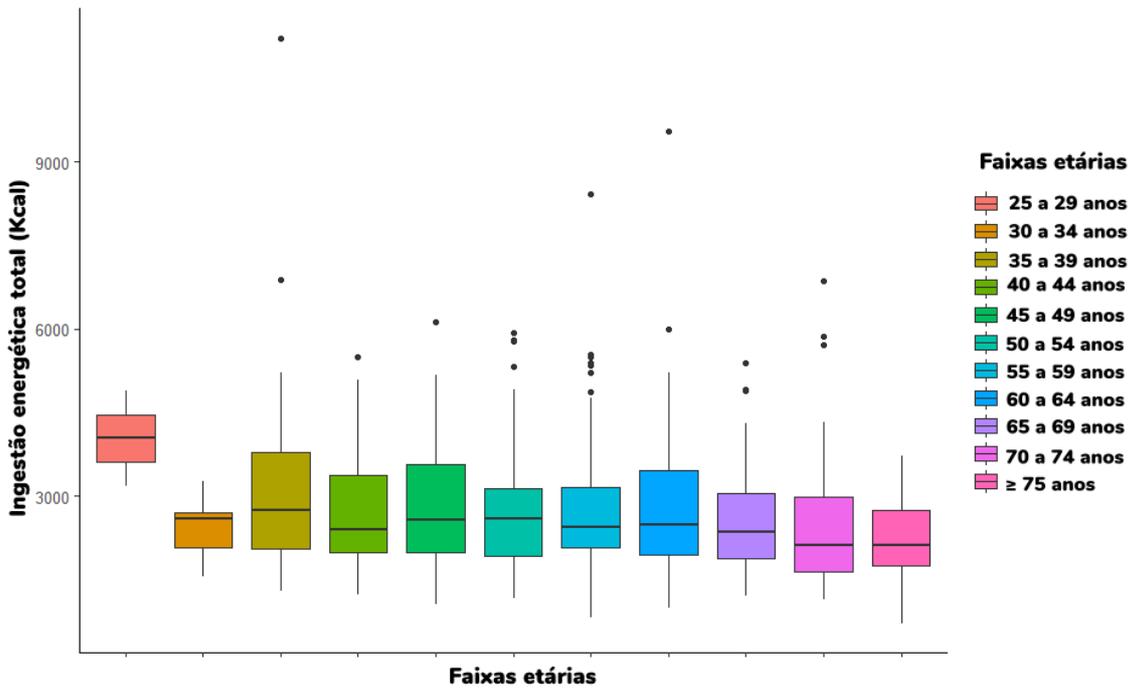


Figura 6 - Ingestão energética de acordo com a faixa etária dos sujeitos incluídos no estudo (N=774).

3.7.6 Covariáveis

O estado nutricional foi categorizado em índice de massa corporal [IMC: peso (Kg) / altura (m)²], utilizando o peso e altura auto-referido. Para adultos de 18 a 59 anos, o IMC <18,5kg/m² foi classificado com Desnutrição/Baixo peso; o IMC de 18,5 a 24,9kg/m² foi classificado como Eutrofia e o IMC ≥ 25 e < 29,9 kg/m² foi classificado como Pré obesidade, já o IMC ≥ 30,0 kg/m² foi classificado como obesidade ¹¹⁷. Para pacientes com idade > 60 anos essas categorias foram definidas respectivamente por IMC <23 kg/m²; 23,0-28,0 kg/m² e > 28 kg/m² ¹¹⁸.

3.7.7 Análise Estatística

Para comparação entre os grupos no que se refere a contribuição calórica e ingestão de fibras alimentares na, realizamos a verificação das hipóteses de normalidade e

homogeneidade. A partir disso, assumimos a não normalidade dos dados e utilizamos o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis. Foi utilizado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O modelo de regressão logística multinomial univariada foi utilizado para cálculo do odds ratios (ORs) com intervalos de confiança de 95% (ICs), para avaliar a chance de o indivíduo estar no grupo controle. As covariáveis que apresentaram valores de p significativo ($< 0,05$) foram incluídas na modelagem final. Para análise de sobrevivência global e por doença específica, foram utilizadas as curvas de Kaplan-Meier com o teste de log rank. Para a análise de Cox foi verificada a hipótese de proporcionalidade entre as variáveis e selecionadas para o modelo múltiplo aquelas que apresentaram diferença estatística no modelo univariado, e/ou relevância clínica. Os dados foram analisados utilizando o software SPSS Statistics for Windows v.23.0 e também no programa RStudio (versão 3.5.1; RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, EUA) em conjunto com a estatística Janaina Germano do grupo de estatística do A.C.Camargo Cancer Center.

Para análise dos dados metagenômicos utilizamos o pacote Phyloseq, no programa RStudio. Antes de todas as análises verificamos as hipóteses de normalidade dos dados, utilizamos testes paramétricos e não paramétricos a depender do resultado, para testar as diferenças na abundância de filos e gêneros bacterianos, entre os grupos adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos. Para análise *LEFSE* foi utilizada a metodologia e o software proposto por Segata et al. ¹¹⁹, que realiza a análise em 3 partes: I- Kruskal-Wallis para detectar características com abundância diferencial significativa em relação aos grupos; II – Teste de soma de postos de Wilcoxon (não emparelhado); III- Análise discriminante linear Tamanho do efeito (LDA).

Para análise da diversidade Alfa (Observed, Shannon e Simpson) utilizamos os testes paramétrico (Anova e teste t) e não paramétrico (Kruskal-Wallis e U de Mann-Whitney), a depender dos grupos avaliados e da normalidade verificada. Em relação à diversidade Beta (índice de Bray-Curtis e distâncias unweighted e weighted Unifrac), foi usado o teste multivariado Analysis of Similarities (ANOSIM). Também foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para correlação entre os dados dietéticos e a abundância bacteriana, considerando associação significativa quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÓDULO 1: INGESTÃO ALIMENTAR E ASSOCIAÇÕES ENTRE CASOS E CONTROLES

4.1.1 Descrição Geral da Coorte Avaliada no Estudo

Inicialmente avaliamos aspectos globais para a melhor compreensão do perfil da amostra em questão. Conforme podemos observar na **Tabela 5**, temos uma coorte muito bem balanceada em relação ao sexo e idade, sendo que o sexo masculino é predominante entre os indivíduos com adenocarcinoma gástrico, representando em média 60% dos casos. A razão de homens/mulheres, quando considerado os casos e controles, foi de 1,49. Essa característica epidemiológica está de acordo com o panorama nacional, visto que as estimativas para o triênio de 2020-2022 relatam uma incidência de 13.360 casos para homens e 7.870 entre as mulheres, uma diferença de 5.490 casos a mais para o sexo masculino, ou uma razão homens/mulheres de 1,7². Cerca de 38% dos indivíduos deste estudo possuem ensino superior, sendo, 42% do grupo AdG e 54% dos controles endoscópicos, proporção essa que pode ser explicada pelo fato desses sujeitos terem sido recrutados em uma instituição privada, onde mais de 65% dos indivíduos desses dois grupos possuem convênio. No grupo controle da campanha de prevenção, observamos uma predominância de indivíduos com ensino médio (39%), que pode estar ligado com o fato de todos os indivíduos deste grupo serem provenientes do SUS. Essa distribuição característica certamente indica diferenças socioeconômicas que impactam nos padrões gerais de saúde e estilo de vida¹²⁰.

Tabela 5 - Caracterização geral da coorte incluída no estudo

Variáveis	Grupos				
	Total (752)	Adenocarcinoma gástrico (AdG) (194)	Controles endoscópicos (177)	Controles campanha (381)	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Sexo	Feminino	302 (40)	73 (38)	71 (40)	158 (41)
	Masculino	450 (60)	121 (62)	106 (60)	223 (59)
Acesso	Convênio	263 (35)	147 (76)	116 (66)	0 (0)
	Particular	3 (0,4)	2 (1)	1 (1)	0 (0)
	Sistema Único de Saúde (SUS)	486 (65)	45 (23)	60 (34)	381 (100)
Faixa etária	Até 40 anos	104 (14)	29 (15)	26 (15)	49 (13)
	De 45 a 60 anos	322 (43)	82 (42)	71 (40)	169 (44)
	Acima de 60 anos	326 (43)	83 (43)	80 (45)	163 (43)
Grau de instrução	Analfabeto	77 (10)	27 (14)	8 (5)	42 (11)
	Ensino fundamental	129 (17)	29 (15)	22 (12)	78 (20)
	Ensino médio	258 (34)	57 (29)	52 (29)	149 (39)
	Ensino superior	288 (38)	81 (42)	95 (54)	112 (29)
Etnia auto referida	Branco	431 (57)	128 (66)	123 (69)	180 (47)
	Preto/Negro	70 (9)	11 (6)	4 (2)	55 (14)
	Asiático	93 (12)	19 (10)	17 (10)	57 (15)
	Pardo e outros	158 (21)	36 (19)	33 (19)	89 (23)
Estado civil	Casado	559 (74)	147 (76)	129 (73)	283 (74)
	Divorciado/ Separado	57 (8)	12 (6)	12 (7)	33 (9)
	Solteiro	89 (12)	23 (12)	19 (11)	47 (12)
	Viúvo e outros	47 (6)	12 (6)	17 (10)	18 (5)
IMC	Eutrofia	187 (25)	46 (24)	47 (27)	94 (25)
	Pré obesidade	312 (42)	69 (36)	86 (49)	157 (41)
	Obesidade	167 (22)	43 (22)	37 (21)	87 (23)
Diabetes	Sim	106 (14)	33 (17)	24 (14)	49 (13)
	Não	642 (86)	160 (83)	152 (86)	330 (87)
Carga tabágica	<30 maços por ano	657 (87)	148 (76)	161 (91)	348 (91)
	>30 maços por ano	95 (13)	46 (24)	16 (9)	33 (9)

Cont./ Tabela 6

Variáveis		Grupos			
		Total (752)	Adenocarcinoma gástrico (AdG) (194)	Controles endoscópicos (177)	Controles campanha (381)
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Inibidores de bomba de prótons	Sim	249 (33)	121 (63)	73 (41)	55 (15)
	Não	497 (67)	70 (37)	103 (59)	324 (85)
Uso de antiácidos	Sim	80 (11)	42 (22)	32 (18)	6 (2)
	Não	669 (89)	151 (78)	144 (82)	374 (98)
	Ignorado	37 (10)	30 (15)	7 (4)	0 (0)
<i>H. pylori</i>	Negativo	266 (72)	128 (66)	138 (78)	0 (0)
	Positivo	68 (18)	36 (19)	32 (18)	0 (0)

4.1.2 Caracterização do Perfil Alimentar de Casos e Controles

As escolhas alimentares têm sido amplamente estudadas por serem determinantes do conteúdo de nutrientes ingeridos, o que impacta na qualidade alimentar, que por sua vez é extensivamente associada a impactos biológicos associados à saúde ou doença ^{56,71,121,122}. Optamos então por caracterizar e contextualizar a dieta dos sujeitos incluídos no estudo para melhor compreensão de possíveis associações no decorrer das análises. Para todos os três grupos da coorte na comparação múltipla, observamos uma diferença estatisticamente significativa da contribuição calórica dos alimentos, tanto entre os grupos alimentares *in natura*/minimamente processados, quanto nos ultraprocessados (em ambos um valor de $p < 0,001$) (Figura 7 e Apêndices 1 e 2). No consumo de alimentos *in natura*/minimamente processados os indivíduos com AdG possuem uma ingestão média de alimentos *in natura* de 36,78%, enquanto que no grupo controles campanha é de 41,31% (*Kruskal Wallis*, $p = < 0,001$). Também encontramos uma diferença estatística na comparação entre os dois grupos controle, visto que o controle endoscópico tem uma ingestão menor de alimentos *in natura*/minimamente processados (37,4% versus 41,31% do controle campanha; *Kruskal Wallis*, $p = 0,001$). De acordo com nossos achados nesse quesito não encontramos diferença entre o grupo com câncer e os controles endoscópico, demonstrando então que o grupo controle da campanha de prevenção tem em sua dieta uma participação maior desses alimentos menos processados.

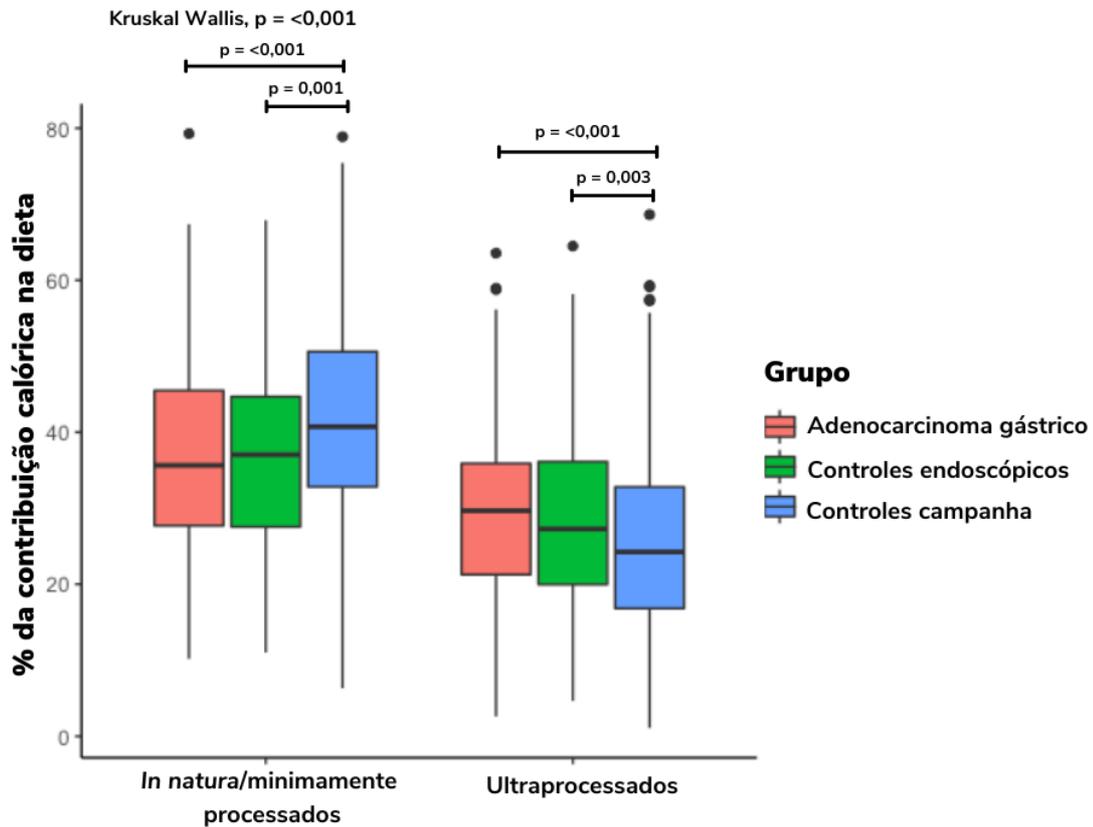


Figura 7 - Comparação múltipla da contribuição energética de alimentos in natura e ultraprocessados na dieta. **Nota.** Teste kruskal Wallis, p valor significativo quando $< 0,05$.

Dentre os alimentos *in natura*, estão as frutas e as hortaliças, as quais são umas das principais fontes de fibras alimentares da dieta e seu consumo diário é extensivamente relatado pelo seu potencial protetor em alguns tipos de câncer, como o de cabeça e pescoço, conforme relatado em um estudo multicêntrico brasileiro ¹²³. Este efeito está ligado à densidade nutricional desses alimentos, ou seja, uma alta quantidade de nutrientes como vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos, associado com uma quantidade relativamente baixa de calorias ^{116,117}. Dentre os alimentos *in natura* que mais contribuíram na dieta dos grupos foram: arroz branco, café, aveia em flocos, banana, laranja/mexerica e leite integral, um ponto importante a se considerar é que as frutas e hortaliças não estão entre os mais consumidos, conforme Apêndice 2. Na figura 8, podemos observar uma representação da proporção da ingesta de frutas e hortaliças com diferença estatística na comparação entre os três grupos (Apêndice 1), podemos evidenciar que existe uma maior contribuição desses alimentos na dieta dos grupos controle, principalmente dos controles da campanha de prevenção.

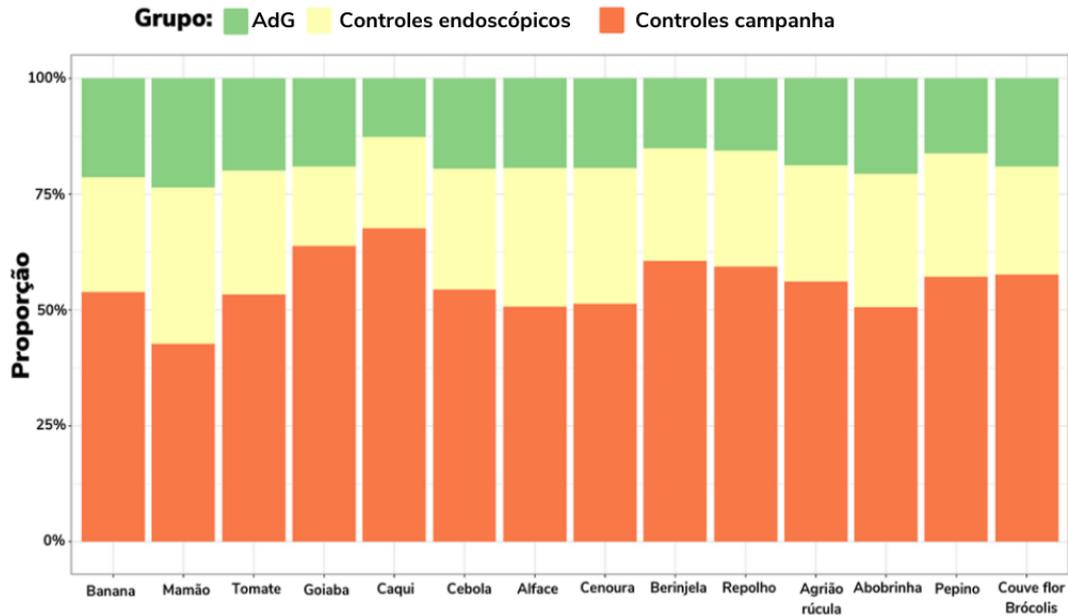


Figura 8 - Proporção do consumo das frutas e hortaliças que apresentaram diferença estatística na comparação entre os grupos no Apêndice 4.

Já em relação aos alimentos ultraprocessados também observamos diferença significativa entre o grupo AdG e o grupo controle da campanha de prevenção (Figura 7). Os pacientes com câncer apresentaram uma ingestão média de 28,9% destes alimentos, enquanto que os controles saudáveis relataram ingestão correspondente a 24,9%, uma diferença de 5% na contribuição calórica total da dieta (*kruskal Wallis*, $p < 0,001$). Também encontramos uma diferença estatística quando comparamos grupos controles endoscópicos e controles saudáveis da campanha de prevenção (*kruskal Wallis*, $p = 0,003$), onde este último apresentou uma participação dietética ainda menor de alimentos industrializados (Figura 7). Um ponto importante é que o consumo aumentado desses alimentos tem sido associado a diversas doenças crônicas não transmissíveis^{57,59,118}, por conta da sua baixa qualidade nutricional, grande quantidade de sódio, calorias totais, gorduras, açúcar e baixa quantidade de fibras. Vale ressaltar, que seu alto consumo está relacionado não apenas a uma menor ingestão de nutrientes, mas também a um menor consumo de alimentos não-ultraprocessados, conforme evidenciado em um estudo de corte transversal que analisou mais de 12 mil australianos¹²⁷. Esse perfil de produtos alimentícios tem sido descrito como de formulações que surgiram por serem de mais fácil preparo, mais convenientes e muito palatáveis, atendendo assim a uma necessidade das sociedades ocidentalizadas. Assim, ao longo do tempo ocorreu uma substituição dos padrões dietéticos mais antigos, aos quais nossa microbiota havia se ajustado ao longo de milhares de anos, originalmente baseados em alimentos mais íntegros⁵⁵.

Vale ressaltar que não encontramos diferenças no consumo de alimentos processados entre todos os grupos, visto que apresentam uma média de consumo similar e próxima a 33%. Embora esse valor represente 1/3 da dieta, esses alimentos são caracterizados por serem produzidos pela adição de sal, óleo, açúcar, ou outro ingrediente culinário a um alimento do grupo 1, ou seja, a um alimento *in natura*/minimamente processado^{53,55,54}. Sendo assim, esse tipo de processamento não torna o alimento ou preparação em algo potencialmente danoso para a saúde do indivíduo, visto que pode até melhorar aspectos de biodisponibilidade de alguns nutrientes e compostos bioativos, como o licopeno, que dentro de um contexto de estilo de vida balanceado pode ter um papel quimiopreventivo^{70,121,122}.

Nesse sentido, podemos observar até o momento que o perfil de dieta difere entre os grupos com e sem câncer, e que os sujeitos dos estudos apresentam médias de consumo de alimentos *in natura*/minimamente processados abaixo da média da população brasileira que é de 58,1%¹²⁶, sendo que o grupo controle da campanha de prevenção (ingestão de 41%) foi o que mais se aproximou da média nacional.

4.1.3 Caracterização da Ingestão de Fibras Alimentares e sua Associação com a Dieta

Tendo em vista as características da dieta dos grupos do presente estudo, avaliamos então a quantidade de fibras alimentares ingeridas. Conforme **Tabela 6**, podemos observar que existe uma diferença estatística no consumo de fibras totais, solúveis e insolúveis entre os três grupos comparados. Na comparação múltipla (**Figura 9**) podemos identificar que essa diferença é mais pronunciada quando se compara o grupo AdG *versus* ambos os grupos controle, de forma independente do tipo de fibras avaliadas. Os indivíduos com AdG mostraram uma ingestão de fibras totais com uma mediana de 10,13g para cada 1000 kcal ingerida, já os controles endoscópicos ingeriram 11,40g (*kruskal Wallis*, $p=0,012$) e os controles saudáveis 10,80g (*Casos versus controles campanha; kruskal Wallis*, $p=0,013$), demonstrando a menor ingestão de fibras no grupo com câncer. Esses dados corroboram nossos achados anteriores em relação ao processamento dos alimentos, onde esses mesmos indivíduos possuem uma ingestão menor de alimentos *in natura*/minimamente processados.

Tabela 7 - Ingestão de fibras entre os sujeitos do estudo

Variáveis	Adenocarcinoma gástrico	Controles endoscópicos	Controles Campanha	P valor
Fibra total (g/1000 Kcal)	194	177	381	0,005
Mínimo	3,33	4,52	4,79	
Máximo	22,61	21,88	25,88	
Média	10,44	11,55	11,43	
Mediana	10,13	11,40	10,8	
DP	3,23	3,71	3,72	
Fibra solúvel (g/1000 Kcal)	194	177	381	0,012
Mínimo	0,24	0,47	0,26	
Máximo	6,31	7,5	10,63	
Média	2,04	2,37	2,41	
Mediana	1,77	2,06	2,05	
DP	1,14	1,32	1,45	
Fibra insolúvel (g/1000 Kcal)	194	177	381	0,001
Mínimo	0,42	0,9	0,57	
Máximo	11,07	9,8	13,48	
Média	3,07	3,73	3,68	
Mediana	2,93	3,55	3,18	
DP	1,43	1,77	2,10	

Nota. Teste kruskal Wallis, p valor significativo quando $p < 0,05$. DP = Desvio padrão.

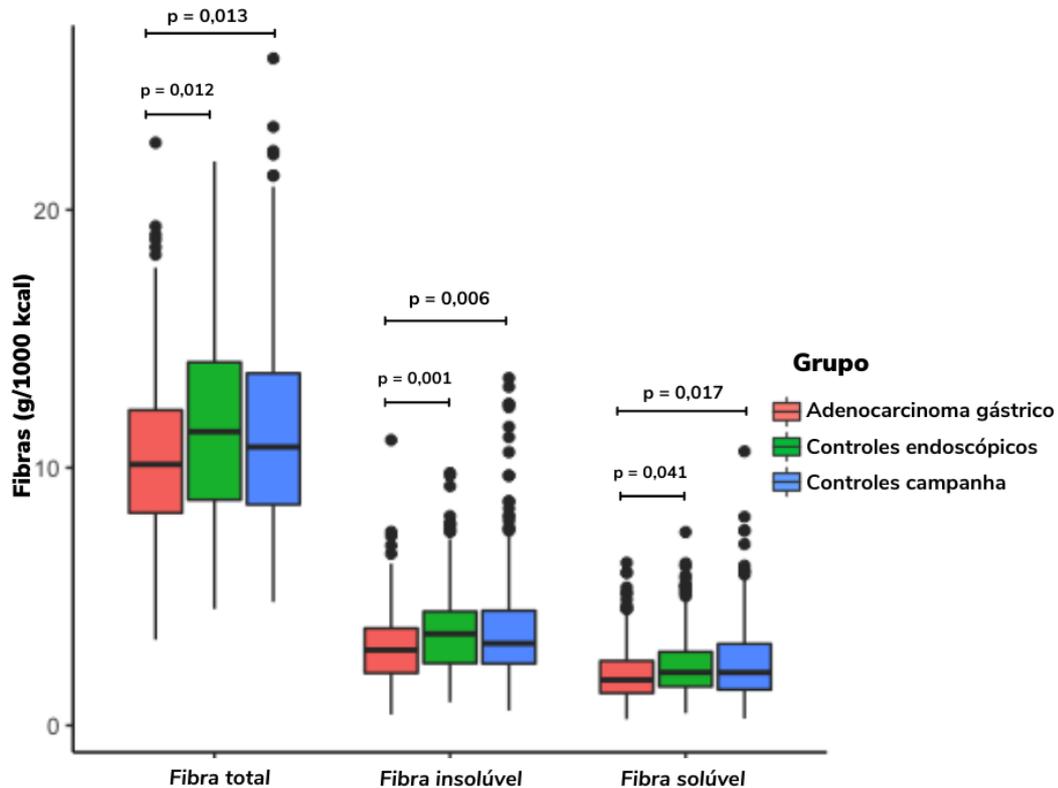


Figura 9 - Comparação múltipla da ingestão de fibras. Nota. Teste *kruskal Wallis*, p valor significativo quando $< 0,05$. Nota. Teste *kruskal Wallis*, p valor significativo quando $p < 0,05$. DP = Desvio padrão.

Neste sentido, um estudo com a população brasileira encontrou uma média de consumo de 11,2g de fibras totais para 1000 kcal. Já um outro trabalho mais detalhado demonstrou que o consumo de fibras é diferente entre as regiões norte, nordeste, sudeste, sul e centro-oeste, diferença esta que também foi encontrada entre as regiões urbanas e rurais em todas as regiões brasileiras. Os autores evidenciaram maior consumo em domicílios rurais das regiões Norte e Nordeste que tiveram uma ingestão média de 21,4 g/dia e 18,5 g/dia, respectivamente; e menor em domicílios urbanos do Centro-Oeste, Sul e Sudeste, aproximadamente 10g/dia. Vale ressaltar que ¹³⁰.

É importante observar que em todos os grupos estudados a mediana de consumo de fibras totais está abaixo do recomendado, que é de 14g de fibras para cada 1000 kcal ingeridas ⁸¹, fato este que a longo prazo pode estar relacionado com uma perturbação contínua da microbiota, por diminuir a fonte de substrato energético de diversas bactérias ^{92,78}.

O Guia alimentar da População Brasileira sugere que o grau de processamento dos alimentos pode impactar no perfil de nutrientes ingeridos ⁵⁵. Neste contexto avaliamos a partir dos quartis de consumo de fibra alimentar total a contribuição dos alimentos segundo seu grau de processamento, conforme Figura 9. Evidenciamos um perfil de dieta característico ao longo dos quartis, para todos os grupos avaliados, mostrando que temos uma diferença estatística entre os quartis, tanto para a quantidade de alimentos *in natura*, quanto para os ultraprocessados (Tabela 5). Os processados também apresentaram perfil similar, com exceção do grupo com AdG, onde não encontramos diferença estatística na ingestão de alimentos processados entre os quartis de consumo de fibra.

O grupo AdG que está no quartil 1 e conseqüentemente consome menos fibras, tem uma média de ingestão de alimentos *in natura* de 25,51% enquanto os que estão no quartil 4 relatam uma ingestão de 48,04%. Esse mesmo efeito foi observado para ambos os grupos controles, sendo que os endoscópicos possuem uma contribuição de 26,5% de alimentos *in natura* no quartil 1, enquanto que no quartil 4 foi de 47,08%.

Já para controles endoscópicos, no quartil 1 uma média de 30,86% e no quartil 4 uma contribuição de 51,98% de alimentos *in natura*, mostrando que quanto maior o consumo de fibras maior é a contribuição de alimentos *in natura* na dieta, independente do grupo avaliado (**Tabela 5**). Um ponto interessante foi que dos 196 pacientes com AdG, apenas 32 estão no quartil 4, enquanto temos 54 controles endoscópicos e 105 controles da campanha de prevenção neste mesmo quartil, evidenciando que existe uma maior quantidade de indivíduos

controles neste último grupo, exatamente pelo fato deles consumirem mais alimentos *in natura* do que o grupo AdG.

Para os alimentos ultraprocessados podemos observar na Tabela 5, que para os indivíduos que estão no quartil 4 temos uma contribuição de apenas 20% deste grupo de alimentos. Conforme podemos verificar na Figura 10 o perfil de dieta entre os quartis 1 e 4 são bem distintos, dessa forma para melhor compreender o impacto biológico dos resultados é necessário analisar as diferenças entre esses grupos.

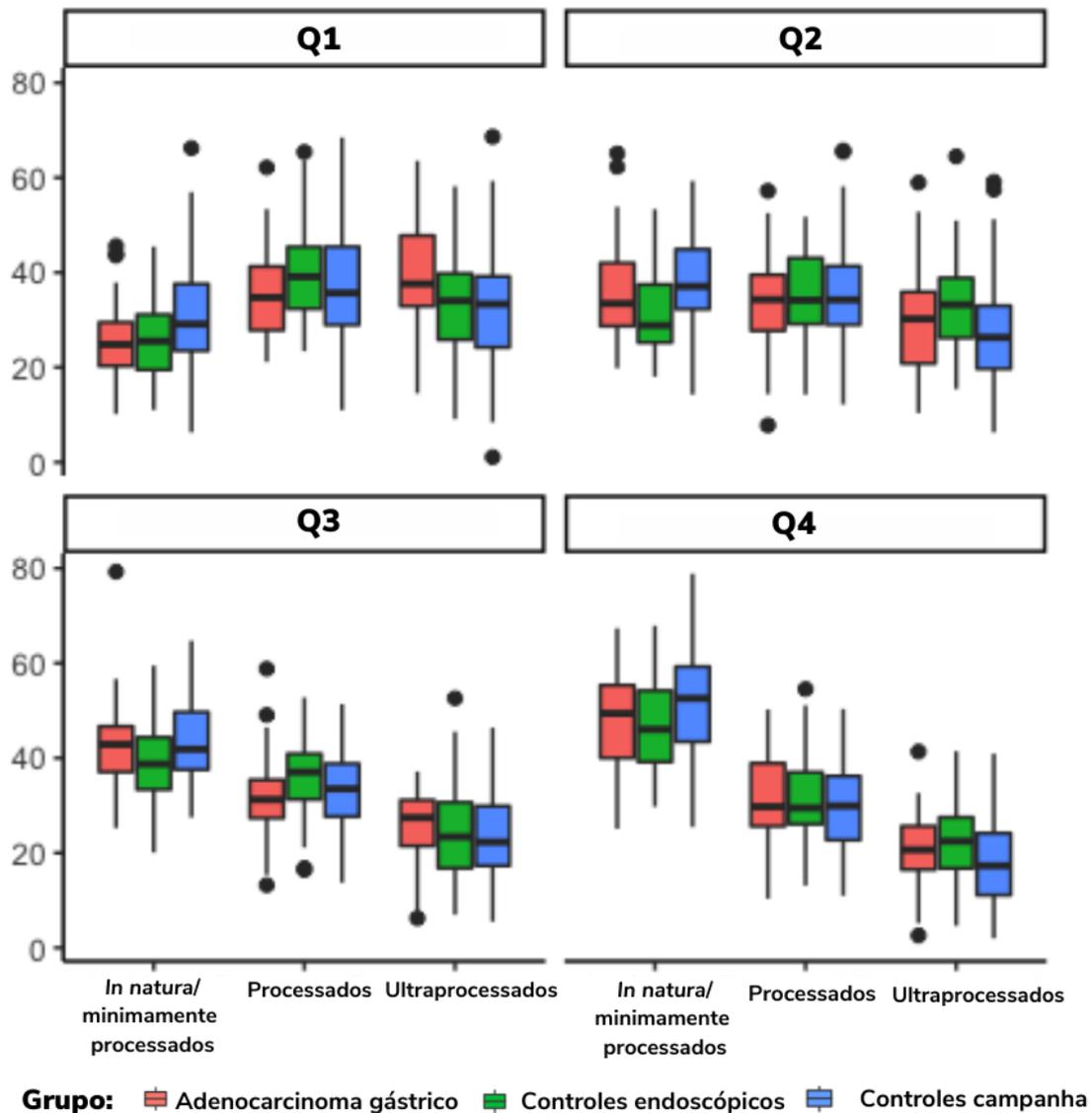


Figura 10 - Participação dos grupos alimentares ao longo dos quartis de consumo das fibras totais.

Tabela 7 - Participação dos grupos alimentares ao longo dos quartis de consumo das fibras totais

		Ingestão relativa média (% da contribuição energética)															
		Quartil da ingestão de fibras alimentares totais para cada 1000 kcal															
		Q1				Q2				Q3				Q4			
		(0 a 8,51g)				(8, 52 a 10,68g)				(10,69 a 13,43g)				(≥13,44g)			
Grau de processamento	Grupo	N total	Média	Mediana	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	P valor
In natura e minimamente processados	Adenocarcinoma gástrico	194	36,78	35,63	55	25,51	7,50	56	35,95	10,18	51	42,77	8,84	32	48,04	10,78	<0,001
	Controles endoscópicos	177	37,04	37,04	41	26,50	8,58	38	31,70	8,56	44	39,19	8,48	54	47,03	10,08	<0,001
	Controles campanha	381	41,31	40,71	91	30,86	11,18	93	37,67	9,77	92	43,15	8,36	105	51,98	11,12	<0,001
Processados	Adenocarcinoma gástrico	194	33,25	32,78	55	35,20	9,44	56	33,97	9,77	51	31,49	8,58	32	31,42	9,80	0,153
	Controles endoscópicos	177	34,95	34,95	41	39,44	9,93	38	34,89	10,16	44	35,57	8,45	54	31,08	9,06	0,001
	Controles campanha	381	33,70	33,41	91	36,87	11,81	93	35,10	10,05	92	33,55	7,96	105	29,86	9,38	<0,001
Ultra processados	Adenocarcinoma gástrico	194	29,98	29,67	55	39,29	10,63	56	30,09	11,93	51	25,74	7,28	32	20,54	8,61	<0,001
	Controles endoscópicos	177	28,02	27,28	41	34,06	11,21	38	33,40	9,92	44	25,25	10,67	54	21,89	8,18	<0,001
	Controles campanha	381	24,98	24,25	91	32,27	12,63	93	27,23	10,73	92	23,30	8,58	105	18,16	9,06	<0,001

Nota. Teste kruskal Wallis, p valor significativo quando <0,05.

Com base nos resultados apresentados até aqui, verificamos possíveis associações por meio de um modelo de regressão logística multinomial com variáveis dietéticas e de estilo de vida de indivíduos dos grupos controle *versus* AdG (Tabela 6). Observamos que o fato de ter ensino superior completo aumento a chance de ser do grupo controle endoscópico em 2.7 vezes (OR 2,790, IC 95% 1,068-7,285, $p=0,036$), enquanto que ter esse mesmo grau de escolaridade aumenta a chance em 8,5 vezes (OR 8,566, IC 95% 1,616-45,418, $p=0,012$) em ser do grupo controle saudável. Ser negro aumentou a chance em 3,4 vezes (OR 3,475, IC 95% 1,431-8,440, $p=0,006$) em ser do grupo controle campanha, mas vale ressaltar que esse grupo é proveniente do sistema único de saúde (SUS), e deve ser visto dentro do contexto histórico de grande desigualdade racial e socioeconômica que temos em nosso país. Para o índice de massa corporal, ser do grupo de baixo peso mostrou diminuir a chance em 84,7% (OR 0,153, IC 95% 0,055-0,427, $p=<0,0001$) em ser do grupo controle endoscópico e em 62% (OR 0,380, IC 95% 0,179-0,805, $p=0,012$) de ser do grupo controle campanha, sempre comparando com o grupo AdG. Essa associação inversa do baixo peso com os controles está possivelmente ligada à redução de peso observada nos pacientes com câncer gástrico desde o diagnóstico.

Foi possível identificar que consumir menos alimentos ultraprocessados (quartil 1), está associado com aumento de 2.5X (OR 2,521, IC 95% 1,076-5,905, $p=0,033$) na chance de ser do grupo controle campanha. Já o maior consumo de fibras alimentares insolúveis aumentou a chance em 2.6x (OR 2,651, IC 95% 1,069-6,573, $p=0,035$) de ser desses mesmos grupos, quando comparado com o grupo AdG. Não encontramos esse tipo de associação com os controles endoscópicos *versus* grupo AdG, sugerindo uma ingestão de ultraprocessados similar entre estes grupos (Figura 7 e Apêndice 3). Vale ressaltar que o alto consumo de alimentos ultraprocessados tem sido associado a diversas doenças em estudos de coorte prospectivos ou casos controles, evidenciando por exemplo uma associação com diabetes mellitus tipo 2⁶⁰ e câncer de próstata⁵⁹. Infelizmente o consumo destes alimentos tem sido cada dia mais precoce, sendo que as crianças são expostas desde os primeiros anos de vida^{109,124} e a longo prazo este hábito pode gerar um excesso de ingestão calórica, conforme demonstrado por pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos¹³². Neste mesmo estudo, caracterizado por ser um ensaio clínico randomizado e controlado de ingestão alimentar, foi investigado se as pessoas consumiram mais calorias quando expostas a uma dieta *ad libitum* composta de alimentos ultraprocessados, em comparação com uma dieta composta de alimentos não ultraprocessados (*In natura*, minimamente processados e processados). Ambas as dietas oferecidas eram equilibradas entre si em termos de calorias,

açúcar, gordura, sódio, fibra e macronutrientes; porém foi observado que os indivíduos que consumiram mais calorias quando expostos à dieta ultraprocessada em comparação com a dieta não processada, com um adicional calórico de 508 kcal/dia, contribuindo assim para desenvolvimento de diabetes e obesidade.

Outro ponto que vai além da ingestão calórica é a presença de aditivos alimentares, que levou alguns pesquisadores a avaliarem a composição de 126 mil alimentos comumente comercializados em mercados da França. Cerca de 53,8% dos produtos alimentícios continham pelo menos 1 aditivo alimentar e 11,3% tinham pelo menos 5 aditivos, sendo que os aditivos mais usados foram ácidos cítrico, lecitinas e amidos modificados. Já dentre os 50 aditivos avaliados, os principais foram: nitrito de sódio, nitrato de potássio, glutamato monossódico e caramelo sulfito de amônia⁶⁵. Várias destas substâncias têm sido associadas a um perfil mais pró-inflamatório¹³³.

Nossos resultados acerca dos possíveis impactos positivos das fibras alimentares insolúveis demonstraram que essas fibras podem ter um potencial protetor, quando o grupo controle saudável foi comparado com o grupo AdG. Este efeito pode também estar associado a sinergia alimentar entre alguns compostos bioativos, como no caso dos compostos polifenóis, que em um estudo recém publicado analisou 3471 indivíduos com câncer gástrico e 8344 controles em 6 países, evidenciando um papel protetor de toda esta classe de compostos¹³⁴.

Uma grande limitação dos trabalhos com um perfil mais epidemiológico é que eles não levam em conta em suas análises possíveis efeitos das fibras alimentares e outros contribuintes dietéticos a nível da microbiota, limitando-se a avaliar apenas a ingestão alimentar. Dessa forma, consideramos que analisar e integrar esses dados é uma das alternativas para a melhora na compreensão do exato papel dos fatores protetores e de risco.

Tabela 8 - Associação entre variáveis de estilo de vida e hábitos alimentares entre os grupos controles versus adenocarcinoma gástrico, conforme determinado pela regressão logística multinomial.

Variáveis	Grupos							
	Controles endoscópicos versus Adenocarcinoma Gástrico				Controles campanha versus Adenocarcinoma Gástrico			
	OR	95% IC		P valor	OR	95% IC		P valor
Inferior		Superior	Inferior			Superior		
Grau de instrução								
Analfabeto e < 5 anos	1				1			
Ensino fundamental	2,224	0,775	6,384	0,138	1,615	0,710	3,675	0,253
Ensino médio	2,566	0,963	6,834	0,059	1,391	0,638	3,031	0,406
Ensino superior	2,790	1,068	7,285	0,036	0,623	0,284	1,368	0,238
Moradia								
Própria	1				1			
Alugado	0,841	0,408	1,737	0,641	1,732	0,899	3,339	0,101
Emprestado e outros	8,566	1,616	45,418	0,012	10,357	2,042	52,537	0,005
Fornecido pelo governo/empresa	1,048	0,081	13,565	0,971	2,293	0,225	23,316	0,483
Etnia								
Branco	1				1			
Preto/Negro	0,407	0,114	1,448	0,165	3,475	1,431	8,440	0,006
Asiático	0,744	0,329	1,682	0,478	1,884	0,898	3,954	0,094
Pardo e outros	0,920	0,496	1,707	0,791	1,404	0,790	2,493	0,247
IMC								
Eutrofia	1				1			
Baixo peso/Desnutrição	0,153	0,055	0,427	<0,001	0,380	0,179	0,805	0,012
Pré obesidade	1,343	0,751	2,402	0,320	1,257	0,704	2,245	0,439
Obesidade	0,813	0,412	1,602	0,549	1,097	0,569	2,114	0,783
Quartis alimentos <i>in natura</i>								
Quartil 1	1				1			
Quartil 2	0,930	0,466	1,857	0,838	1,497	0,755	2,968	0,248
Quartil 3	0,733	0,333	1,616	0,442	1,259	0,583	2,718	0,557
Quartil 4	0,551	0,206	1,473	0,235	1,648	0,656	4,138	0,287
Quartis alimentos ultra processados								
Quartil 4	1				1			
Quartil 3	1,099	0,564	2,140	0,782	1,033	0,529	2,020	0,924
Quartil 2	1,634	0,783	3,409	0,191	1,790	0,872	3,671	0,112
Quartil 1	1,795	0,740	4,351	0,196	2,521	1,076	5,905	0,033
Quartil Fibra alimentar total								
Quartil 1	1				1			
Quartil 2	1,085	0,525	2,246	0,825	0,965	0,483	1,930	0,920
Quartil 3	1,390	0,553	3,491	0,484	0,628	0,264	1,491	0,292
Quartil 4	2,666	0,860	8,258	0,089	0,527	0,177	1,570	0,250
Quartil Fibra solúvel								
Quartil 1	1				1			
Quartil 2	0,792	0,368	1,708	0,553	0,641	0,305	1,346	0,240
Quartil 3	0,791	0,307	2,041	0,628	0,655	0,261	1,643	0,367
Quartil 4	0,887	0,302	2,611	0,828	1,271	0,442	3,659	0,656
Quartil Fibra insolúvel								
Quartil 1	1				1			
Quartil 2	1,087	0,514	2,299	0,827	2,089	1,014	4,305	0,046
Quartil 3	1,396	0,615	3,167	0,425	1,258	0,558	2,832	0,580
Quartil 4	1,611	0,627	4,139	0,322	2,651	1,069	6,573	0,035

Cont/Tabela 8

Variáveis	Grupos							
	Controles endoscópicos <i>versus</i> Adenocarcinoma Gástrico			Controles campanha <i>versus</i> Adenocarcinoma Gástrico				
	OR	95% IC	P valor	OR	95% IC	P valor		
Uso de omeprazol ranitidina pantoprazol e similares								
Sim	1			1				
Não	2,496	1,553	4,011	<0,001	12,808	7,826	20,963	<0,001
Antiácidos								
Sim	1			1				
Não	0,922	0,505	1,684	0,791	12,396	4,530	33,925	<0,001
Carga tabágica								
>30 maços por ano	1			1				
<30 maços por ano	2,515	1,284	4,925	0,007	2,532	1,348	4,754	0,004

Nota. OR: Razão de chances. IC: Intervalo de confiança.

4.1.4 Análise de Sobrevida Entre os Indivíduos com Adenocarcinoma Gástrico e Associações com Variáveis Dietéticas

Visto a importância e relevância dos dados dietéticos na etiologia da doença, decidimos realizar algumas análises de sobrevida para identificar um possível impacto nos indivíduos do grupo AdG e sua sobrevida após o diagnóstico. Nesse contexto, o tempo mediano de seguimento dos pacientes foi de 20 meses. Em relação ao tempo de sobrevida global e por doença específica não foi possível calcular o tempo médio, visto que conforme figura abaixo o último ponto não ultrapassou 50% da curva. Um ponto importante e que é uma limitação da análise de sobrevida em nosso trabalho é esse tempo de acompanhamento que de forma geral faz inclusive essas curvas de sobrevida serem bem similares.

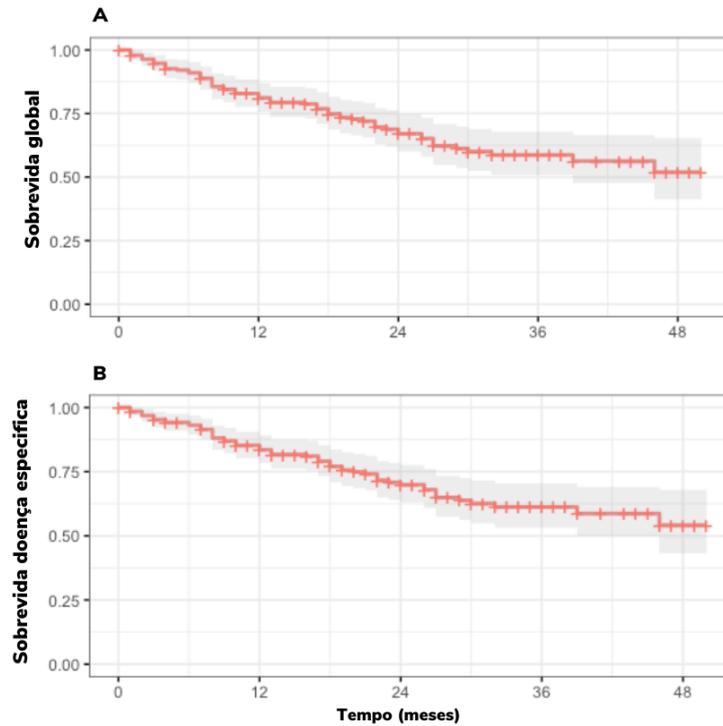


Figura 11 - Curva de sobrevida global e doença específica de toda coorte.

Estratificamos então as análises de para os quartis de ingestão de alimentos in natura/ minimamente processados, processados e ultraprocessados conforme curvas de kaplan Meier da **Figura 12** e também paras as fibras totais, solúveis e insolúveis (**Figura 13**). Não identificamos diferenças na sobrevida quando estratificação por essas variáveis, visto que, elas tiveram uma mediana de sobrevida similar, como no caso das fibras totais onde em todos os quartis a probabilidade de estar vivo em 26 meses após o diagnóstico foi de 70%.

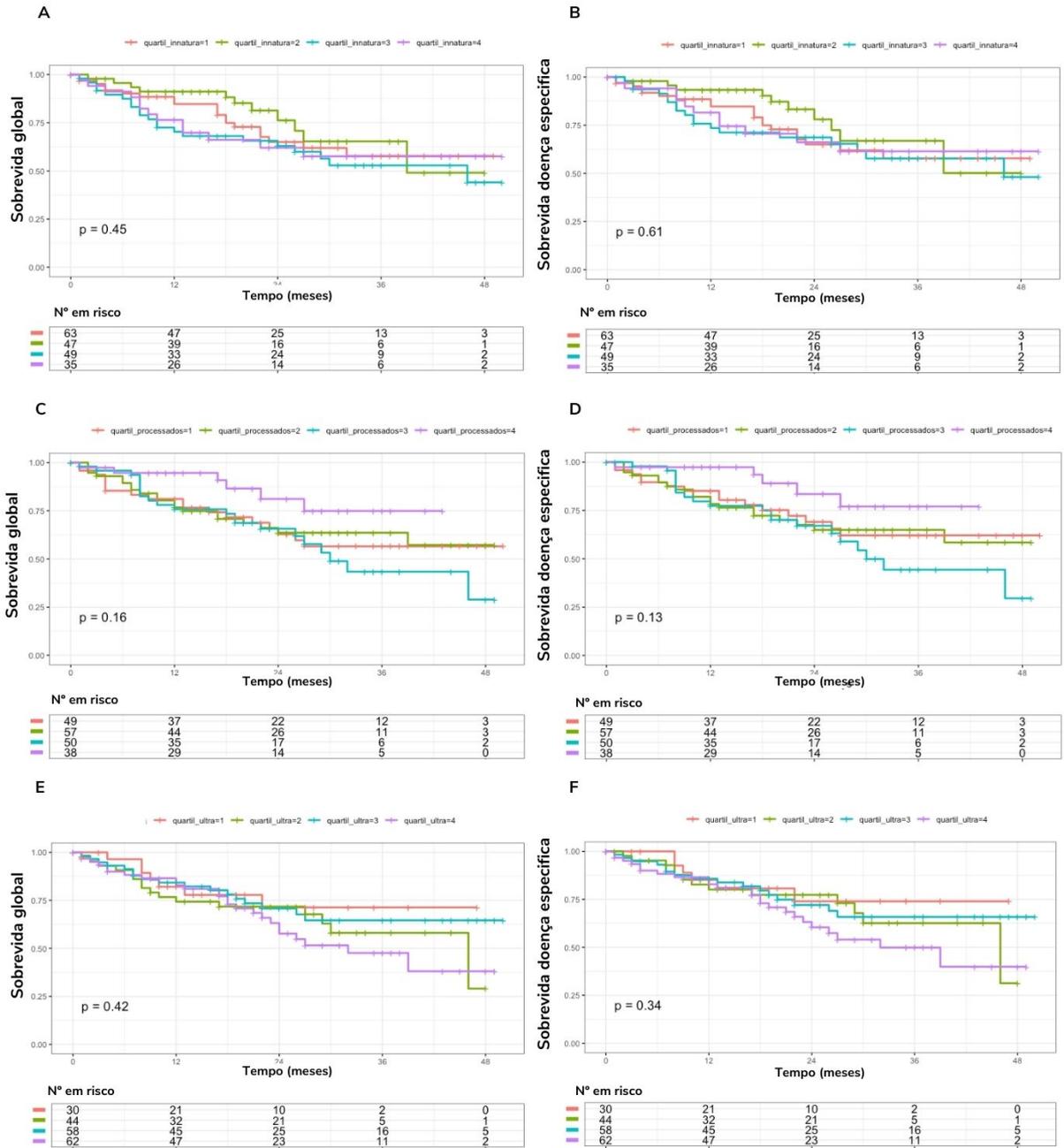


Figura 12 - Curvas de sobrevida global e por doença específica de indivíduos com adenocarcinoma gástrico de toda coorte, estratificado pelos quartis de consumo de alimentos in natura, processados e ultraprocessados.

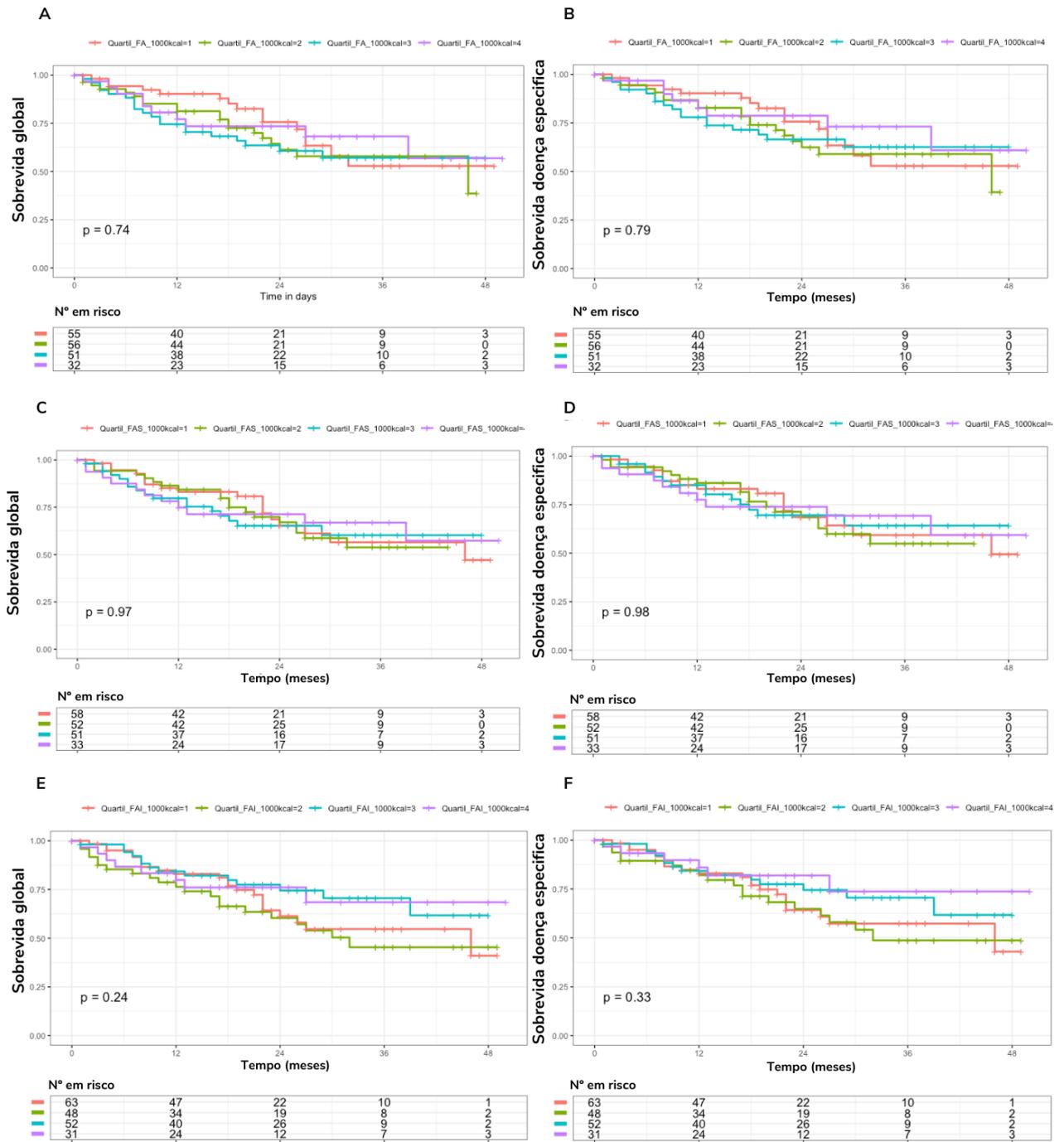


Figura 13 - Curvas de sobrevida global e por doença específica de indivíduos com adenocarcinoma gástrico de toda coorte, estratificado pelos quartis de consumo de fibras totais, solúveis e insolúveis. **Nota.** Foi utilizado o teste não paramétrico de Log-rank.

Dentre as variáveis testadas analisamos a sobrevida por doença específica estratificada pelo estadiamento da doença. Observar que mesmo com um tempo curto de seguimento, foi possível observar que os indivíduos com metástase logo no diagnóstico possuem um tempo menor de seguimento, como esperado. Conforme Figura 14, a mediana de sobrevida para o grupo metastático foi de 17 meses (IC 95% 0,345-0,621), enquanto nesse mesmo tempo a probabilidade de sobrevida de um indivíduo com doença localizada foi de 92% (IC 95% 0.879-0,974). Baseado nesse resultado decidimos realizar a construção de um modelo de COX para avaliar o risco de ir a óbito considerando as variáveis que atingiram suposições de proporcionalidade.

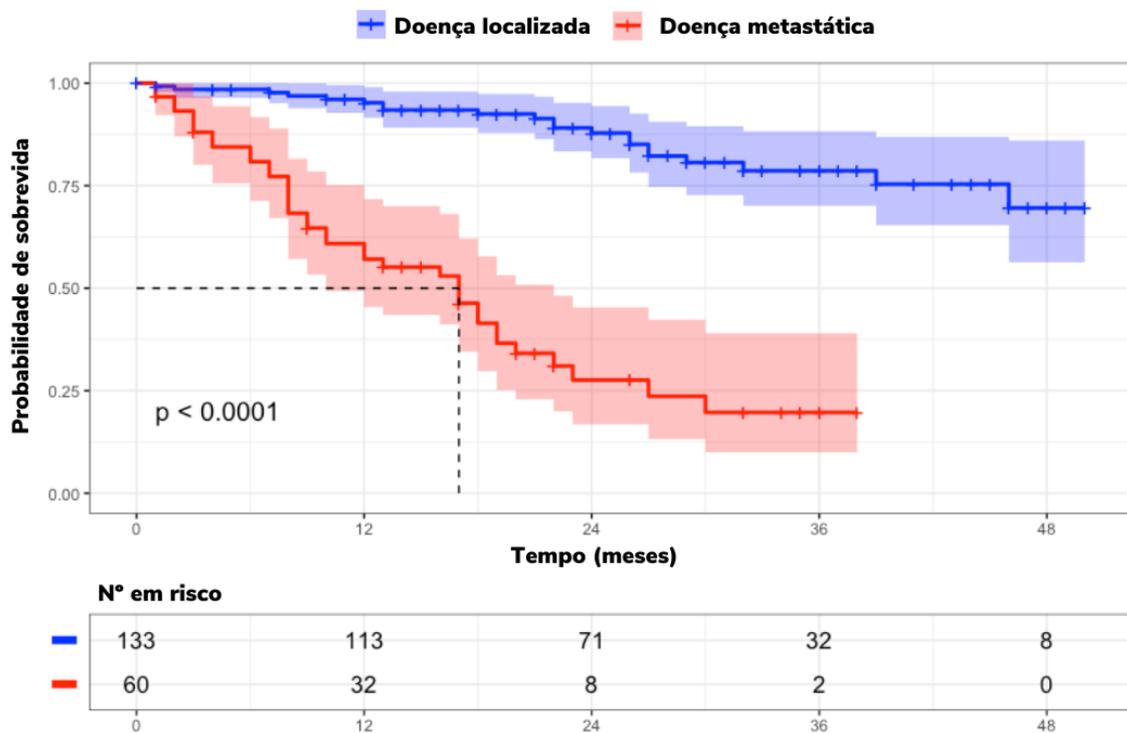


Figura 14 - Curvas de sobrevida por doença específica de indivíduos com adenocarcinoma gástrico de toda coorte, estratificado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico. **Nota.** Linha pontilhada representa mediana. Foi utilizado o teste não paramétrico de Log-rank.

Conforme **Tabela 7**, identificamos que a doença metastática aumenta em 10x o risco de óbito quando consideradas diversas variáveis dietéticas e de estilo de vida, tendo como referência os indivíduos com doença localizada. Vale ressaltar que a razão de chances apresentou um intervalo de confiança amplo (4,97-20,35) que nos indica ter um pouco de cautela com esses dados que podem estar sendo influenciados pelo tamanho amostral e pelo curto tempo de acompanhamento. Não identificamos impacto das variáveis dietéticas nesse

modelo de regressão final. O impacto das variáveis dietéticas têm sido amplamente estudado em termos de sobrevivência, porém os estudos são feitos em geral com coortes grandes como no caso do estudo Francês realizado por Schnabel et al.¹³⁵ que associou o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados com um aumento de 10% mortalidade por todas as causas avaliadas (1,14; IC de 95%, 1,04-1,27; P = 0,008).

Tabela 9 - Modelo de regressão multivariada de Cox para doença específica nos indivíduos do grupo AdG (N=192).

Variáveis	HR	95% CI		P valor
		Inferior	Superior	
Sexo				
Feminino	1			
Masculino	1,112	0,559	2,211	0,763
Idade				
Até 44 anos	1			
De 45 a 60 anos	0,884	0,343	2,281	0,799
Acima de 60 anos	1,395	0,501	3,885	0,524
IMC				
Eutrofia	1			
Baixo peso/Desnutrição	0,701	0,277	1,775	0,454
Pré obesidade	0,423	0,200	0,895	0,025
Obesidade	0,266	0,094	0,748	0,012
Estadiamento do câncer gástrico no diagnóstico				
Doença localizada	1			
Doença metastática	10,062	4,974	20,354	<0,001
Quartis alimentos <i>in natura</i>				
Quartil 1	1			
Quartil 2	0,748	0,284	1,971	0,557
Quartil 3	1,448	0,416	5,033	0,561
Quartil 4	2,316	0,391	13,713	0,355
Quartis alimentos processados				
Quartil 1	1			
Quartil 2	1,646	0,74	3,662	0,222
Quartil 3	1,476	0,55	3,962	0,439
Quartil 4	0,813	0,181	3,652	0,787
Quartis alimentos ultraprocessados				
Quartil 1	1			
Quartil 2	2,277	0,62	8,361	0,215
Quartil 3	2,443	0,62	9,622	0,202
Quartil 4	4,188	0,735	23,858	0,107
Quartil Fibra alimentar total				
Quartil 1	1			
Quartil 2	1,349	0,56	3,25	0,505
Quartil 3	1,447	0,447	4,689	0,538
Quartil 4	1,768	0,399	7,826	0,453
Quartil Fibra alimentar solúvel				
Quartil 1	1			
Quartil 2	1,262	0,522	3,054	0,605
Quartil 3	1,009	0,288	3,542	0,989
Quartil 4	1,529	0,381	6,129	0,549
Quartil Fibra alimentar insolúvel				
Quartil 1	1			
Quartil 2	0,771	0,349	1,702	0,519
Quartil 3	0,462	0,162	1,317	0,148
Quartil 4	0,991	0,253	3,884	0,990

Nota. HR: Razão de riscos. IC: Intervalo de confiança.

4.1 MÓDULO 2: ANÁLISE DO BACTERIOMA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S DO RNA RIBOSSOMAL

4.1.1 Caracterização e diferenças entre Casos e Controles

A avaliação da microbiota bacteriana encontrada no lavado gástrico foi feita pelo sequenciamento de amplicons da região V3 e V4 do gene 16S rRNA, a partir de um subgrupo de pacientes do grupo AdG (N = 77) e controles endoscópicos (N=68). Conforme podemos observar na tabela 8, embora o número de indivíduos deste subgrupo represente apenas cerca de 38,8% do total de 373 sujeitos recrutados (entre casos e controles endoscópicos), ainda assim temos uma boa representação e balanceamento a nível de sexo e idade em relação a amostra total (Tabela 3). Como exemplo, o sexo masculino perfaz 63,6% dos casos no subgrupo e na amostra total 60%, de acordo com o perfil epidemiológico nacional². A partir deste módulo 2, não incluiremos a avaliação da microbiota do controle campanha, visto que a realização de endoscopia digestiva alta não foi realizada nestes indivíduos, pois não seria ético submetê-los a um exame invasivo sem necessidade médica.

Tabela 10 - Características clínicas e de estilo de vida de um subgrupo de casos e controles 2, que tiveram o microbioma do lavado gástrico avaliado.

Variáveis	Total (145)	Adenocarcinoma gástrico (77)	Controles endoscópicos (68)	
	N (%)	N (%)	N (%)	
Sexo	Feminino	61 (42,1)	28 (36,4)	33 (48,5)
	Masculino	84 (57,9)	49 (63,6)	35 (54,4)
Acesso	Convênio Particular	97 (66,9)	60 (77,9)	37 (54,4)
	Sistema Único de Saúde (SUS)	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,5)
Faixa etária	Até 40 anos	47 (32,4)	17 (22,1)	30 (44,1)
	De 45 a 60 anos	24 (16,6)	12 (15,6)	12 (17,6)
	Acima de 60 anos	60 (41,4)	34 (44,2)	26 (38,2)
Grau de instrução	Analfabeto	61 (42,1)	31 (40,3)	30 (44,1)
	Ensino fundamental	19 (13,1)	14 (18,2)	5 (7,4)
	Ensino médio	21 (14,5)	12 (15,6)	9 (13,2)
Etnia auto referida	Ensino superior	36 (24,8)	17 (22,1)	19 (27,9)
	Branco	69 (47,6)	34 (44,2)	35 (51,5)
	Preto/Negro	92 (63,4)	48 (62,3)	44 (64,7)
Estado civil	Asiático	5 (3,4)	2 (2,6)	3 (4,4)
	Pardo e outros	16 (11,0)	9 (11,7)	7 (10,3)
	Casado	32 (22,2)	18 (23,4)	14 (20,6)
Estado civil	Casado	112 (77,2)	60 (77,9)	52 (76,5)
	Divorciado/Separado	5 (3,4)	3 (3,9)	2 (2,9)
	Solteiro	20 (13,8)	11 (14,3)	9 (13,2)
	Viúvo e outros	8 (5,5)	3 (3,9)	5 (7,4)

Cont./ Tabela 10

Variáveis	Total (145)	Adenocarcinoma gástrico (77)	Controles endoscópicos (68)	
	N (%)	N (%)	N (%)	
IMC	Baixo peso	9 (6,2)	9 (11,7)	0 (0,0)
	Eutrofia	40 (27,6)	22 (28,6)	18 (26,5)
	Pré-obesidade	69 (47,6)	32 (41,6)	37 (54,4)
	Obesidade	27 (18,6)	14 (18,2)	13 (19,1)
Carga tabágica	<30 maços por ano	121 (83,4)	59 (76,6)	62 (91,2)
	>30 maços por ano	24 (16,6)	18 (23,4)	6 (8,8)
Uso de inibidores de bomba de prótons	Sim	90 (62,9)	55 (72,4)	35 (52,2)
	Não	53 (37,1)	21 (27,6)	32 (47,8)
Uso de antiácidos	Sim	26 (18,1)	13 (16,9)	13 (19,4)
	Não	118 (81,9)	64 (83,1)	54 (80,6)
Resultado da endoscopia digestiva alta	Câncer	77 (53,1)	77 (100,0)	0 (0,0)
	Exame normal	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,9)
	Gastrite superficial	48 (33,1)	0 (0,0)	48 (70,6)
	Gastrite crônica e atrófica	10 (6,9)	0 (0,0)	10 (14,7)
	Metaplasia intestinal	8 (5,5)	0 (0,0)	8 (11,8)
<i>H.pylori</i>	Ignorado	8 (5,5)	6 (7,8)	2 (2,9)
	Negativo	110 (75,9)	56 (72,7)	54 (79,4)
Estadiamento do câncer gástrico	Positivo	27 (18,6)	15 (19,5)	12 (17,6)
	Doença localizada	0 (0,0)	58 (76,3)	0 (0,0)
Classificação de Lauren	Doença metastática	0 (0,0)	18 (23,7)	0 (0,0)
	Difuso	0 (0,0)	42 (56,8)	0 (0,0)
	Intestinal	0 (0,0)	24 (32,4)	0 (0,0)
Quartis dos alimentos <i>in natural</i>/minimamente processados	Misto	0 (0,0)	8 (10,8)	0 (0,0)
	Q1 - 0 a 29,72%	48 (33,1)	27 (35,1)	21 (20,9)
	Q2 - 29,73 a 38,62%	30 (20,7)	17 (22,1)	13 (19,1)
	Q3 - 38,63 a 47,97%	39 (26,9)	17 (22,1)	22 (32,4)
Quartis dos alimentos processados	Q4 - ≥ 47,98	28 (19,3)	16 (20,8)	12 (17,6)
	Q1 - 0 a 27,17%	46 (31,7)	30 (39,0)	16 (23,5)
	Q2 - 27,18 a 33,51%	36 (24,8)	20 (26,0)	16 (23,5)
	Q3 - 33,52 a 40,37%	33 (22,8)	14 (18,2)	19 (27,9)
Quartis dos alimentos ultraprocessados	Q4 - ≥ 47,98	30 (20,7)	13 (16,9)	17 (25,0)
	Q1 - 0 a 18,29%	22 (15,2)	12 (15,6)	10 (14,7)
	Q2 - 18,30 a 26,23%	40 (27,6)	17 (22,1)	23 (33,8)
	Q3 - 26,24 a 34,13%	38 (26,2)	19 (24,7)	19 (27,9)
Quartil de fibras totais (g/1000 kcal)	Q4 - ≥ 34,14%	45 (31,0)	29 (37,7)	16 (23,5)
	Q1 - 0 a 8,51g	37 (25,5)	24 (31,2)	13 (19,1)
	Q2 - 8,52 a 10,68g	34 (23,4)	18 (23,4)	16 (23,5)
	Q3 - 10,69 a 13,43%	30 (20,7)	17 (22,1)	13 (19,1)
Quartis de fibras insolúveis (g/1000 kcal)	Q4 - ≥ 13,44	44 (30,3)	18 (23,4)	26 (38,2)
	Q1 - 0 a 2,28g	38 (26,2)	26 (33,8)	12 (17,6)
	Q2 - 2,29 a 3,14g	33 (22,8)	18 (23,4)	15 (22,1)
	Q3 - 3,15 a 4,27g	34 (23,4)	19 (24,7)	15 (22,1)
Quartis de fibras solúveis (g/1000 kcal)	Q4 - ≥ 4,28g	40 (27,6)	14 (18,2)	20 (29,4)
	Q1 - 0 a 1,34g	42 (29,0)	26 (33,8)	16 (23,5)
	Q2 - 1,35 a 1,99g	35 (24,1)	22 (28,6)	13 (19,1)
	Q3 - 2,00 a 2,89g	36 (24,8)	17 (22,1)	19 (27,9)
	Q4 - ≥ 2,90g	32 (22,1)	12 (15,6)	20 (29,4)

Todas as 145 amostras tiveram as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA amplificadas e sequenciadas com sucesso. Como podemos observar na Figura 15A a saturação da variabilidade bacteriana sequenciada foi atingida com mediana de 14.833 mil *reads*. Vale ressaltar que conforme descrito na metodologia deste trabalho, nosso grupo do Laboratório de Genômica Médica do A.C.Camargo Cancer Center já realizou o sequenciamento de 439 amostras entre biópsias e fluido gástrico do projeto temático (do qual este trabalho faz parte) e identificamos que uma saturação de pelo menos 1000 *reads* já atinge um nível aceitável que cobre toda a diversidade das bactérias presentes nestas amostras. Tendo isso em mente, podemos evidenciar na Figura 15B que nosso subgrupo selecionado para essa parte do projeto também atingiu esse número mínimo de *reads*.

Foi possível identificar um total de 11 filos, 18 classes, 35 ordens, 62 famílias e 114 gêneros bacterianos, sendo que prosseguimos com as análises que serão descritas a seguir utilizando os níveis taxonômicos de filos e de gêneros. Vale ressaltar que a taxonomia é uma classificação que agrupa microorganismos em categorias, com base em suas diferenças e semelhanças, como por exemplo, o tamanho, forma e também a sequência dos genes, o que consequentemente pode impactar em sua função. Em todos os níveis taxonômicos identificamos uma minoria de OTUs classificadas com as nomenclaturas “NA”, “uncultured”, “uncultured bacterium”, identificadores estes utilizados pelo banco de dados SILVA¹⁰⁸ para táxons ainda não anotados na literatura, ou devido a região sequenciada não haver sido suficiente para permitir a identificação precisa das bactérias. Essa limitação já é conhecida e esperada, pois a avaliação da composição do bacterioma pela amplificação de porções do gene rRNA 16S nem sempre permite a identificação das bactérias avaliadas. No entanto, uma alternativa é o uso da técnica de metagenômica *Shotgun sequencing*, que realiza o sequenciamento de todos os ácidos nucléicos da amostra (podendo ser focado em DNA e/ou RNA) e com isso possibilita o sequenciamento de genomas completos e diversos genomas completos, permite uma maior sensibilidade na identificação de gêneros menos abundantes, ou mesmo com baixa cobertura vertical de sequenciamento. Devido a estas limitações, prosseguiremos com a classificação taxonômica apenas das bactérias já anotadas, visto que o estudo da inter-relação entre contribuintes dietéticos e microbiota do fluido gástrico ainda é algo muito novo e fazer análises com gêneros ainda não anotados, não irá contribuir com o trabalho atual. Vale ressaltar, que para ser uma bactéria já anotada, utilizamos o critério de 97% de similaridade entre as sequências) componentes de uma mesma OTU e uma identidade taxonômica mínima de 80% quando comparada com as sequências do banco de dados Silva¹⁰⁸.

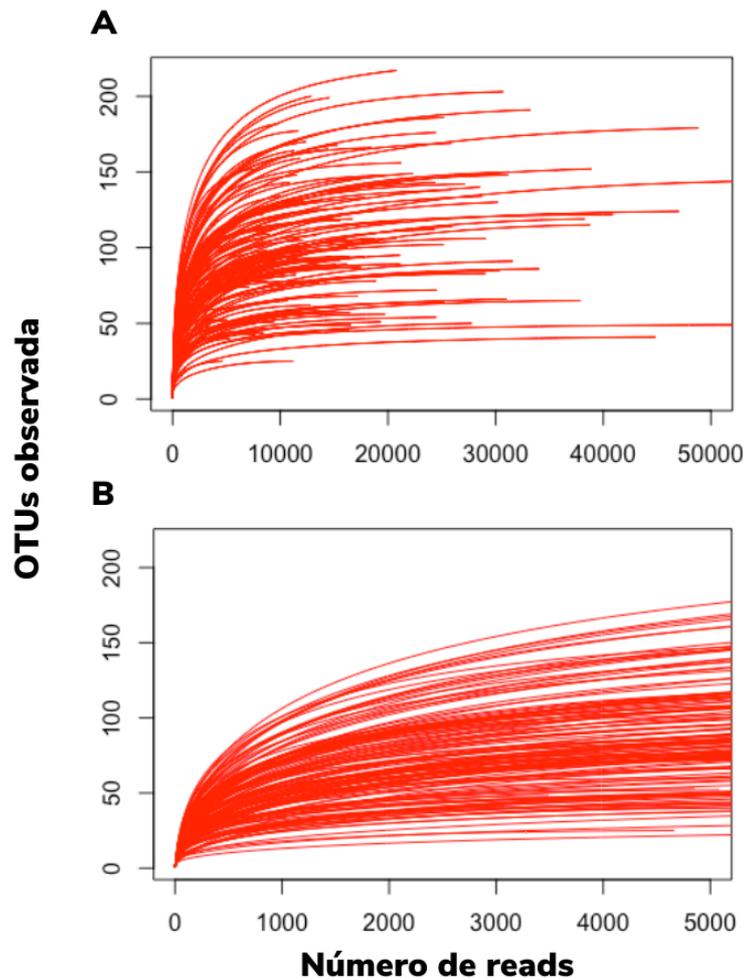


Figura 15 - Curva de saturação das 145 amostras sequenciadas pela técnica 16S. **Nota.** A) Curva do total de *reads* atingidos por amostra. B) Curva mostrando que todas amostras atingem mínimo de 1000 reads.

A nível de filo, o mais abundante entre ambos os grupos foram os *Firmicutes*. Conforme Tabela 9, para o grupo AdG eles são representados por uma mediana de 67%, seguidos pelas *Actinobacterias* (9,55%), *Proteobacterias* (2,85%) e *Bacteroidetes* (2,05%), sendo que os demais filis não são dominantes por representarem menos de 0,5% no grupo com câncer. Para o grupo de controle endoscópico, os *Firmicutes* representam 54%, seguidos das *Proteobacterias* (16%), *Bacteroidetes* (4,89%), *Actinobacterias* (4,50%) e *Fusobacterias* (1%), os demais filis representam menos de 1% da abundancia total. Essa caracterização corrobora com evidências da literatura, onde já é amplamente descrita a predominância desses filis bacterianos no estômago^{25,136,137}. Na Figura 16 podemos observar uma comparação da abundância dos filis entre os grupos AdG e controles. Evidenciamos diferenças estatísticas nos *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* e *Spirochaetes*. No grupo AdG, observamos somente o aumento de *Firmicutes*, que possui maior abundância em 13%. Já as *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* e *Spirochaetes* são mais abundantes no grupo sem câncer.

Embora as *Proteobacterias*, sejam muito relacionadas ao perfil mais inflamatório e consequentemente associadas ao câncer, um estudo chinês que avaliou por rRNA 16S o perfil bacteriano de tecido gástrico tumoral e não tumoral de 80 pacientes, identificou um enriquecimento de *Proteobacterias*, seguido de *Bacteroidetes* nas amostras de tecido gástrico não tumoral. Já em um estudo com 80 indivíduos do México, o segundo filo mais presente foram os *Firmicutes*¹³⁶. Vale ressaltar que neste último estudo, a maioria das amostras eram positivas para infecção por *H. pylori*, e consequentemente isso influencia na predominância de *Proteobacterias*. Um ponto interessante é que em nosso subgrupo de 145 indivíduos que tiveram o lavado gástrico sequenciado, apenas 27 (18,6%) mostrou-se *H. pylori* positivo, sendo 15 (19,5%) do grupo AdG e 12 (17,6%) do grupo controle. Mesmo essa proporção de positividade sendo baixa, testamos as diferenças da abundância de *Proteobacterias* nos indivíduos com AdG e controles sem câncer, estratificando pela presença e ausência de *H. pylori*, e não encontramos diferenças significativas. Vale ressaltar que essa menor proporção de indivíduos positivos para essa bactéria, também foi vista no módulo 1 desse projeto, onde dos 194 indivíduos com AdG, apenas 36 (19%) tem *H. pylori*, conforme Tabela 5. No grupo câncer, esse perfil pode estar relacionado com o fato de, cerca de 56,8% dos nossos casos serem do subtipo histológico difuso, que historicamente tem uma menor incidência de infecção por essa bactéria quando comparado com o subtipo intestinal.

Outro fator que pode influenciar nessa baixa incidência de infecção no nosso grupo, é que na transição de um epitélio normal para um neoplásico, ocorre uma redução de *H. pylori*, característica essa que concomitante com o aumento de outras bactérias orais e intestinais, modificação essa que ocorre principalmente por *H. pylori* causar uma modificação das condições do ambiente gástrico¹³⁸. Essa característica tem sido explicada pela característica “suicida” que *H. pylori* possui, onde ela modifica o ambiente gástrico em situações que antecedem o câncer, ao ponto de impactar e dificultar sua sobrevivência quando já se tem uma doença instalada, conforme mostrado por Assunção et al.¹³⁹. Dessa forma, embora *H. pylori* seja historicamente conhecida como um agente carcinógeno do tipo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC)²³, o papel de outras bactérias vem sendo cada vez mais estudado.

Tabela 11 - Abundância relativa (%) de filos entre os grupos AdG e controles endoscópicos.

Filos	Abundância relativa (%)				P valor
	Adenocarcinoma gástrico		Controles endoscópicos		
	Media (DP)	Mediana (Min - Max)	Media (DP)	Mediana (Min - Max)	
<i>Firmicutes</i>	66,0 (21,00)	67,0 (15,00 - 100,0)	54,0 (23,00)	54,0 (8,39 - 100,0)	<0,001
<i>Actinobacteria</i>	11,80 (11,28)	9,55 (0,00 - 44,00)	6,99 (7,80)	4,50 (0,00 - 33,00)	0,893
<i>Proteobacteria</i>	9,59 (12,63)	2,85 (0,00 - 51,00)	20,97 (2,59)	15,87 (0,00 - 74,0)	0,004
<i>Bacteroidetes</i>	9,50 (12,17)	2,05 (0,00 - 0,49)	14,0 (16,0)	4,89 (0,00 - 51,00)	0,012
<i>Fusobacteria</i>	1,49 (4,92)	0,45 (0,00 - 35,00)	2,30 (3,37)	1,00 (0,00 - 13,00)	0,893
<i>Patensibacteria</i>	1,02 (1,83)	0,33 (0,00 - 11,83)	1,30 (23,00)	0,00 (0,00 - 14,0)	0,484
<i>Chloroflexi</i>	0,0008 (0,0041)	0,00 (0,00 - 0,0236)	0,0003 (0,0016)	0,00 (0,00 - 0,0116)	0,758
<i>Tenericutes</i>	0,0171 (0,06)	0,00 (0,00 - 0,3504)	0,045 (0,12)	0,75 (0,00 - 1,00)	0,071
<i>Synergistetes</i>	0,015 (0,042)	0 (0,00 - 0,30)	0,02 (0,06)	0,02 (0,00 - 0,365)	0,512
<i>Spirochaetes</i>	0,09 (0,261)	0 (0,00 - 1,86)	0,206 (0,439)	0,05 (0,00 - 3,13)	0,040
<i>Epsilonbacteriaeota</i>	0,06(0,21)	0 (0,00 - 1,50)	0,18(0,94)	0,00 (0,00 - 7,69)	0,255

Nota. O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

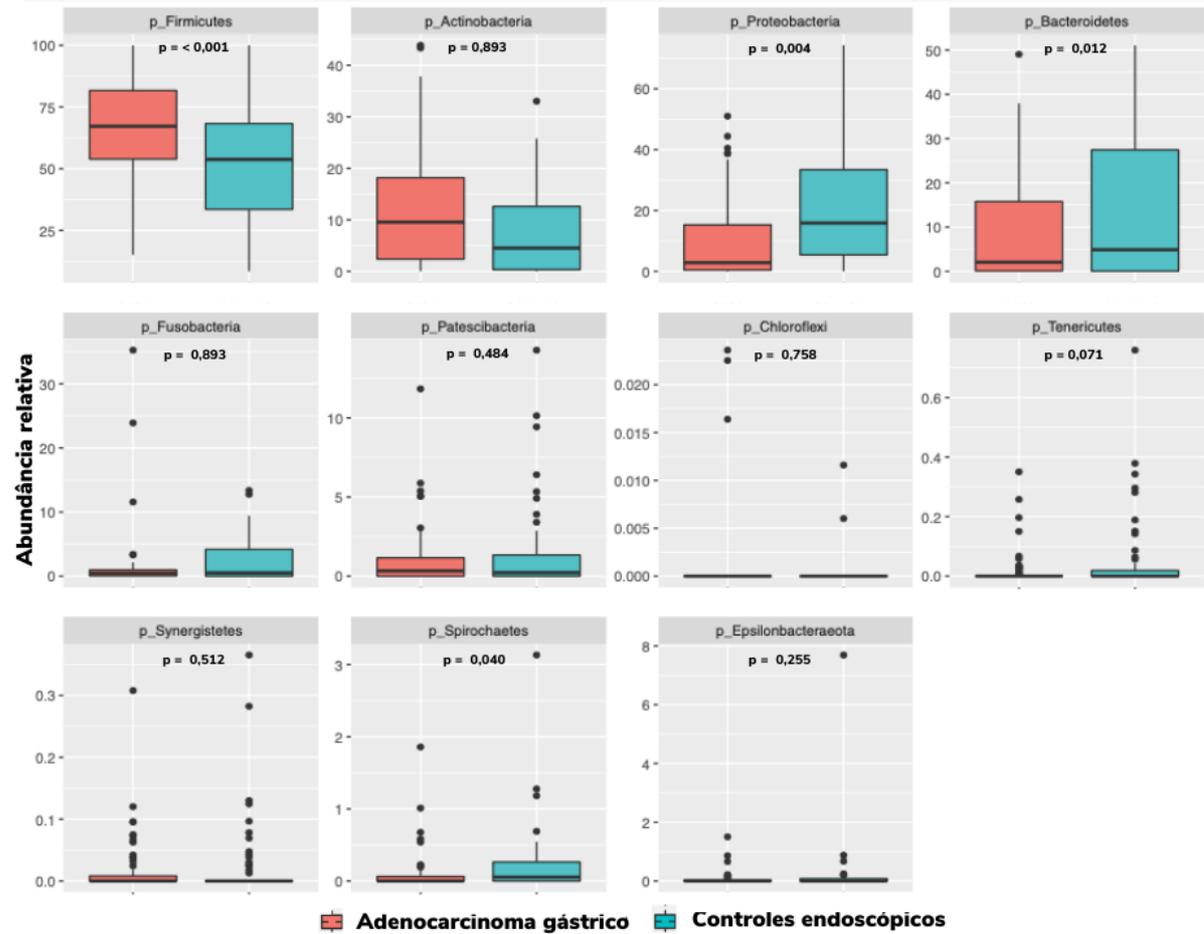


Figura 16 - Análise comparativa da abundância dos filos bacterianos encontrados no lavado gástrico de pacientes apresentando adenocarcinoma gástrico, ou controles sem câncer. **Nota.** O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Decidimos então analisar os filos estratificados pelo laudo da endoscopia, permitindo assim ter uma análise mais profunda e uma melhor comparação acerca dos controles endoscópicos, visto que este grupo possui indivíduos com diferentes classificações patológicas. Inicialmente selecionamos os indivíduos do grupo AdG (N=77) e os grupo controle com mucosa gástrica normal/gastrite superficial (N=50). Na Figura 17, é possível observar os 4 filos que tiveram diferença estatística nessa estratificação: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Spirochaetes. Para os Firmicutes e Actinobactérias evidenciamos uma maior abundância no grupo AdG, enquanto que, as Proteobactérias e Spirochaetes estão mais abundantes nos controles que apresentaram exame normal/gastrite superficial, ou seja, com ausência de inflamação epitelial, ou com um grau mais leve. Vale ressaltar que em nosso grupo controle temos 18 indivíduos com um grau de lesão mais severa, com gastrite crônica e atrófica (N=10) e metaplasia intestinal (N=8). O tamanho amostral limitado inviabilizou a comparação desses dois grupos com os demais (casos e controles com

exame normal/gastrite superficial), porém, testamos a abundância dos filos entre esses controles e não encontramos diferença significativa. Essa limitação também foi encontrada em outro estudo ¹⁴⁰ que avaliou amostras fecais de 47 Chineses que possuíam diferentes graus de alterações epiteliais gástricas, onde os Firmicutes foram mais abundantes na gastrite e na metaplasia, quando comparados a controles (sem achado endoscópico), porém os autores não estratificaram pelo tipo da gastrite, provavelmente devido ao tamanho amostral limitado. Dessa forma, em nosso trabalho, essa limitação não permite identificar se ocorre uma mudança na composição bacteriana ao longo dos diferentes graus de alteração epitelial progressiva em indivíduos sem câncer.

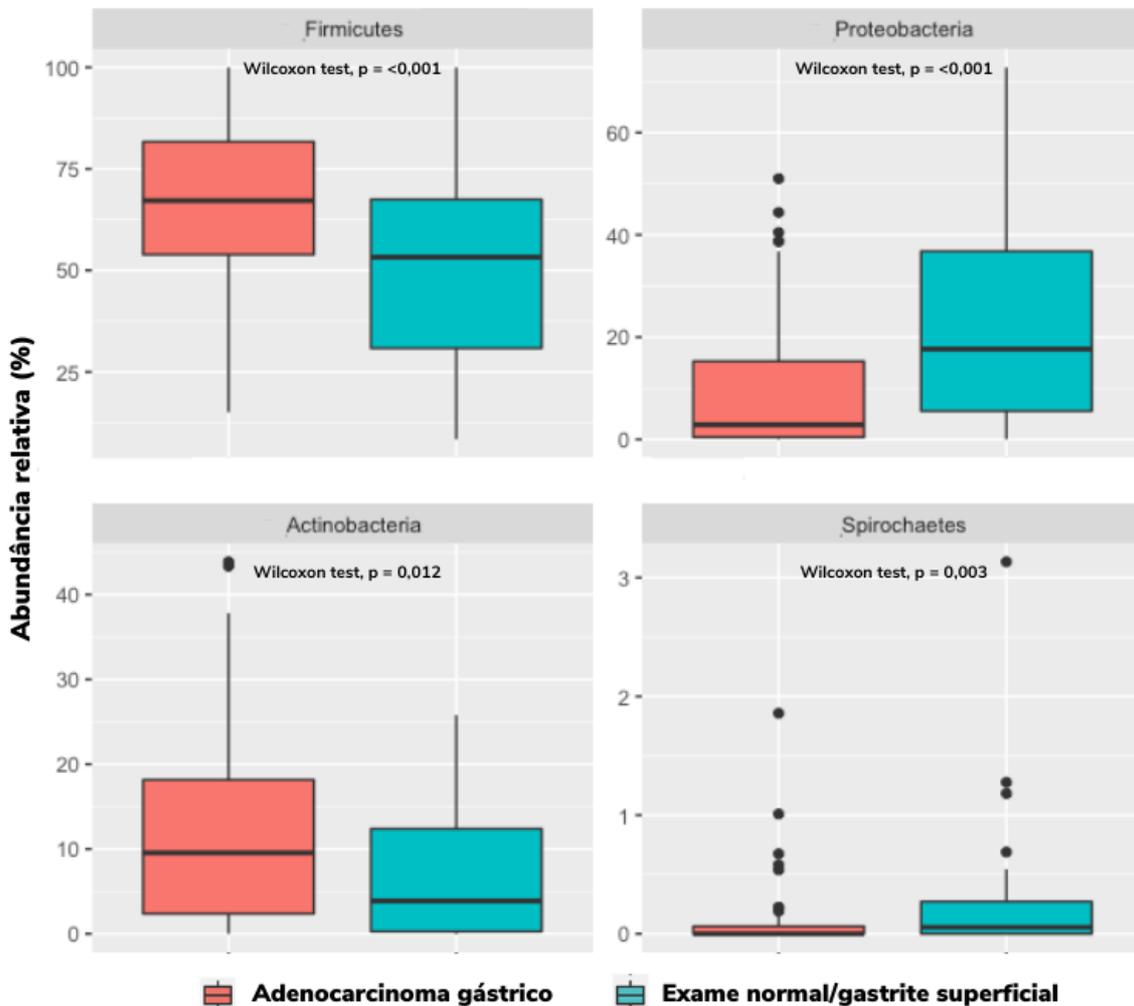


Figura 17 - Análise comparativa da abundância relativa dos filos bacterianos que apresentaram diferença estatística na estratificação pelo resultado da endoscopia digestiva alta quando casos de AdG foram comparados com tecido normal, ou gastrite superficial. Nota. O teste não paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Na Figura 18 podemos observar todos os 114 gêneros bacterianos identificados entre AdGs e controles endoscópicos. Embora exista a presença de uma série de gêneros bacterianos, selecionamos inicialmente os 20 mais abundantes (Tabela 10), ou seja, aqueles que tem uma diferença entre os grupos AdG e controles endoscópicos a, visto que a microbiota é um ecossistema complexo e possivelmente esses gêneros mais presentes têm uma capacidade dominante e influenciam toda a composição, possibilitando então uma maior chance de um efeito biológico mensurável ⁴⁴. Já os demais gêneros menos abundantes representam menos de 0,5% da abundância total.

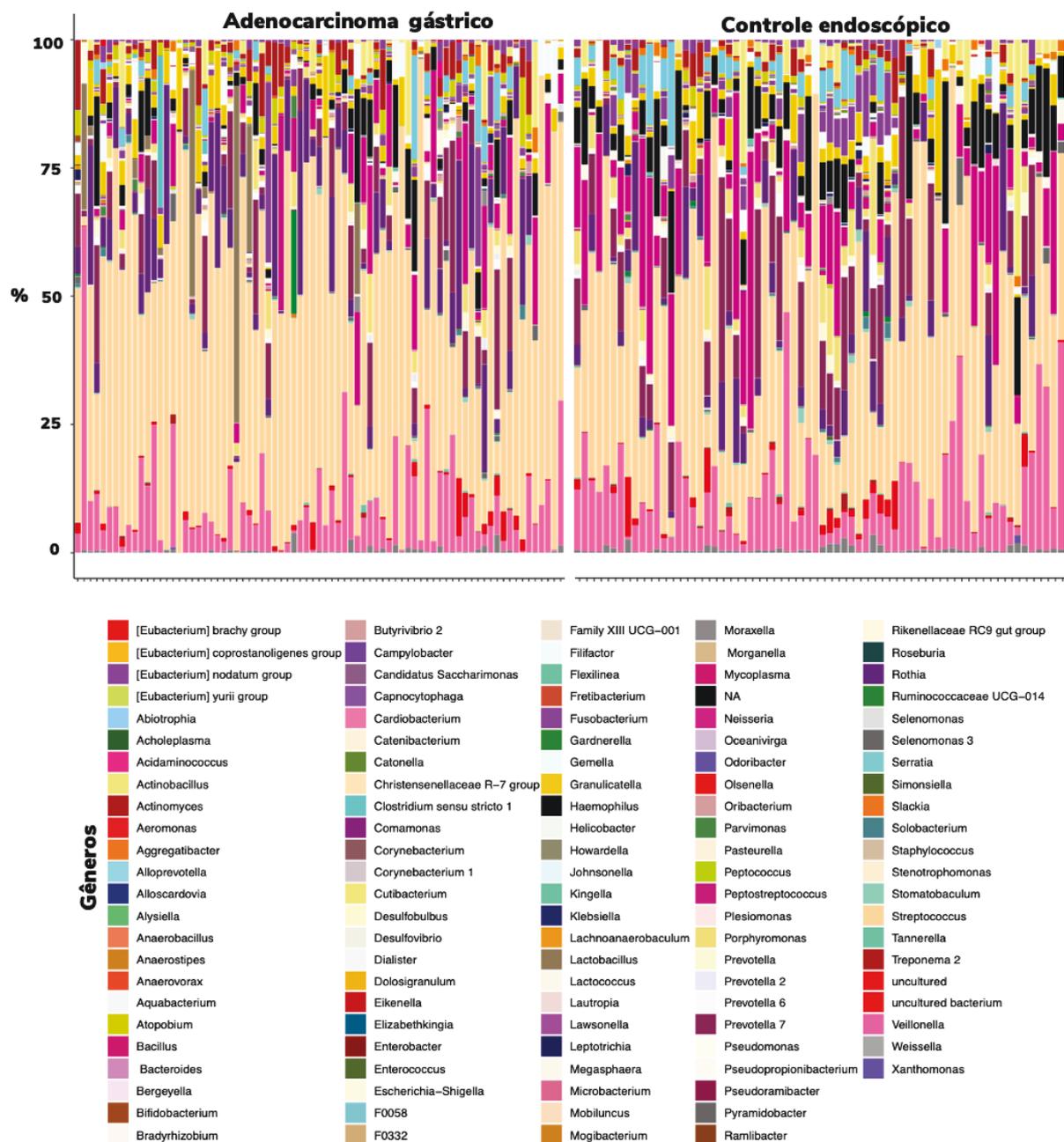


Figura 18 - Abundância de bactérias a nível de gêneros entre casos e controles.

Tabela 12 - Abundância relativa dos 20 gêneros bacterianos mais abundantes entre casos e controles.

Gêneros	Abundância relativa %				P valor
	Adenocarcinoma gástrico		Controle endoscópicos		
	Média (DP)	Mediana (Min - Max)	Média (DP)	Mediana (Min - Max)	
<i>Streptococcus</i>	46,27 (20,98)	46,07 (1,79 - 93,81)	33,85 (18,48)	30,64 (3,49 - 78,99)	<0,001
<i>Veillonella</i>	9,11 (9,73)	6,29 (0,04 - 63,03)	12,06 (9,97)	9,46 (0,38 - 46,66)	0,020
<i>Rothia</i>	7,75 (8,94)	4,33 (0,00 - 35,84)	4,80 (6,20)	2,33 (0,00 - 28,77)	0,053
<i>Prevotella 7</i>	5,34 (7,36)	0,99 (0,00 - 29,64)	7,87 (10,03)	2,66 (0,00 - 43,07)	0,603
<i>Neisseria</i>	4,05 (6,91)	0,44 (0,00 - 31,31)	10,42 (12,51)	5,23 (0,00 - 54,04)	<0,001
<i>Haemophilus</i>	3,24 (5,04)	1,12 (0,00 - 22,10)	7,18 (7,12)	5,67 (0,00 - 27,92)	<0,001
<i>Granulicatella</i>	2,67 (3,26)	1,53 (0,00 - 15,89)	2,85 (3,51)	1,54 (0,00 - 24,05)	0,387
<i>Actinomyces</i>	2,53 (3,38)	0,96 (0,00 - 13,61)	1,43 (2,02)	0,53 (0,00 - 8,79)	0,069
<i>Lactobacillus</i>	2,47 (9,81)	0,00 (0,00 - 65,63)	0,03 (0,07)	0,00 (0,00 - 0,41)	0,070
<i>Actinobacillus</i>	1,56 (3,93)	0,02 (0,00 - 18,52)	2,48 (6,53)	0,23 (0,00 - 46,10)	0,029
<i>Alloprevotella</i>	1,38 (3,34)	0,03 (0,00 - 20,25)	2,34 (3,78)	0,10 (0,00 - 20,26)	0,084
<i>Porphyromonas</i>	1,35 (2,37)	0,29 (0,00 - 11,39)	2,23 (3,91)	0,36 (0,00 - 22,60)	0,432
<i>Atopobium</i>	1,33 (1,99)	0,66 (0,00 - 13,39)	0,60 (0,82)	0,27 (0,00 - 3,87)	0,002
<i>Fusobacterium</i>	1,32 (4,83)	0,22 (0,00 - 35,15)	2,09 (3,18)	0,36 (0,00 - 12,85)	0,260
<i>Gemella</i>	1,28 (2,61)	0,17 (0,00 - 13,07)	1,49 (2,58)	0,27 (0,00 - 11,65)	0,080
<i>Peptostreptococcus</i>	0,77 (4,49)	0,02 (0,00 - 37,99)	0,18 (0,42)	0,01 (0,00 - 2,15)	0,960
<i>Eubacterium nodatum group</i>	0,60 (0,94)	0,26 (0,00 - 4,07)	0,63 (0,87)	0,29 (0,00 - 3,90)	0,977
<i>Prevotella</i>	0,50 (0,82)	0,11 (0,00 - 3,50)	0,64 (0,96)	0,22 (0,00 - 4,25)	0,633
<i>Prevotella 6</i>	0,48 (0,75)	0,07 (0,00 - 3,04)	0,55 (1,12)	0,08 (0,00 - 6,27)	0,835
<i>Megasphaera</i>	0,44 (0,84)	0,22 (0,00 - 6,35)	0,64 (0,99)	0,30 (0,00 - 4,72)	0,228

Nota. DP = Desvio Padrão, Min. = Mínimo, Max. = Máximo. O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Conforme podemos observar na Tabela 10 os 20 gêneros mais abundantes foram: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Prevotella 7*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Actinobacillus*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Atopobium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium nodatum group*, *Prevotella*, *Prevotella 6* e *Megasphaera*. Quando comparado entre os grupos AdG versus controles endoscópicos encontramos uma diferença estatística nos gêneros: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Atopobium* (Tabela 10 e Figura 19).

Nesse contexto, *Streptococcus*, um gênero do tipo gram-positivo do filo *Firmicutes*, foi o mais abundante (46%) em nosso grupo com câncer. O potencial carcinogênico do *Streptococcus* tem sido relatado a produção de pelo de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 pelo hospedeiro, como um mecanismo de defesa a presença de espécies como *Streptococcus bovis*

e *S. gallolyticus*, mas que ao longo prazo pode gerar a produção de algumas moléculas de óxido nítrico e radicais livres (superóxido, peroxinitritos, radicais hidroxila e radicais alquilperoxi) que tem potencial mutagênico no material genético do hospedeiro ¹⁴¹. Este mesmo gênero foi avaliado em um outro estudo contendo 124 amostras de tecido gástrico (62 da lesão cancerosa e 62 da mucosa gástrica adjacente), provenientes de 62 indivíduos que realizaram gastrectomia parcial em um hospital Chinês. Os autores também identificaram que este gênero está mais abundante no tecido tumoral ¹⁴². Vale ressaltar que neste mesmo trabalho foi observada uma interação simbiótica entre *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Dialister* e *Prevotella* no grupo câncer, fato este que pode indicar um papel importante desses gêneros na manutenção do microambiente tumoral. Ferreira et al. ²¹ identificaram um enriquecimento de *Streptococcus*, *Prevotella* e *Neisseria* em amostras de tecido gástrico não tumoral em indivíduos controle com gastrite crônica quando comparado à biopsia de indivíduos com AdG, condição essa que foi independente da infecção por *H. pylori*, que apresentou uma abundância média de 41,7% no grupo controle e 5,7% no grupo câncer. Outro trabalho recente avaliou a microbiota salivar em pacientes em diferentes estágios histológicos progressivos de carcinogênese gástrica, identificando também um maior enriquecimento dos gêneros pró-inflamatórios *Streptococcus* e *Corynebacterium* na microbiota oral de indivíduos com câncer gástrico, quando comparado a portadores de gastrite superficial e gastrite atrófica ¹⁴³. Os autores também identificaram alguns gêneros reduzidos no grupo com câncer, entre eles, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* e *Prevotella*, quando comparado com os grupos sem câncer, mas que possuíam alteração da mucosa gástrica. Corroborando com esses resultados, nós também identificamos uma maior abundância dos gêneros gram-negativos *Haemophilus* e *Neisseria* em nosso grupo controle endoscópico, sendo algumas destas bactérias redutoras de nitrato, que o convertem em nitrito e em óxido nítrico, permitindo então sua absorção ^{144,145}. Dessa forma, esses gêneros podem conter bactérias com um papel protetor, por diminuírem o acúmulo de compostos N-nitrosos, sabidamente carcinogênicos quando acumulados no trato gastrointestinal.

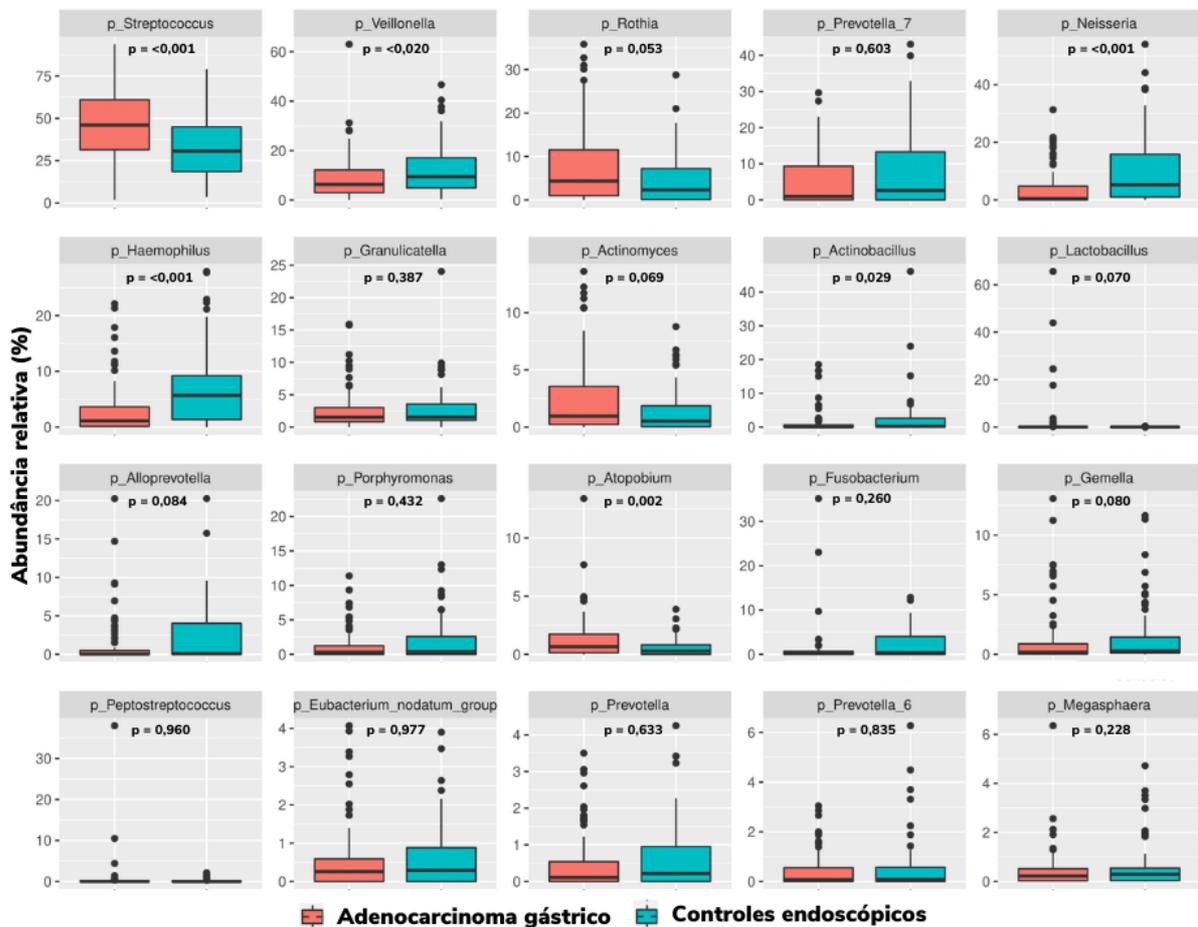


Figura 19 - Análise comparativa da abundância relativa entre os top 20 filos bacterianos entre casos e controles. **Nota.** O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

O gênero *Atopobium* foi mais abundante no grupo AdG, resultado similar encontrado em um outro trabalho do tipo caso-controle, que identificou um enriquecimento de *Atopobium* no grupo com câncer gástrico, quando comparado a controles¹⁴⁶. O mesmo gênero também foi identificado em maior proporção em um trabalho recém publicado, que avaliou a microbiota intestinal de indivíduos com câncer esofágico¹⁴⁷. Resultado similar foi também encontrado em um outro estudo, onde indivíduos diagnosticados com carcinoma espinocelular esofágico também tiveram uma correlação entre esse tipo de câncer e os gêneros *Actinomyces* e *Atopobium*¹⁴⁸. Na cavidade oral, *Atopobium* pode estar mais presente em quadros de periodontites graves¹⁴⁹ além de ter por característica um potencial cariogênico¹⁵⁰. Já no câncer colorretal, Yachida et al.¹⁵³ fizeram análises de metagenômica e metabolômica e identificaram que algumas espécies de *Atopobium* e *Fusobacterium* têm sido fortemente associadas ao longo dos estágios da doença, visto que, *Fusobacterium nucleatum* apresentou uma elevação contínua de carcinoma intramucoso para estágios mais avançados e *Atopobium*

parvulum foi aumentando em adenomas polipóides e em carcinomas intramucosos, além de observarem um aumento significativo de aminoácidos de cadeia ramificada e a fenilalanina nas fezes de indivíduos com carcinomas intramucosos. É possível que estes achados estejam também associados a capacidade dessas bactérias em produzirem sulfeto de hidrogênio a partir da fermentação de compostos que contenham sulfato, metabólito este que possui a capacidade de desencadear maior sinalização em vias pro-inflamatórias, hiperproliferação celular, genotoxicidade, além de inibir a α e a β -oxidação do butirato^{151,152,153}. Já o gênero *Veillonella*, também proveniente do filo *Firmicutes*, foi o segundo gênero mais abundante no grupo controle endoscópico, com uma mediana de 9,46% contra 6,29% do grupo AdG. Embora estejam mais presentes no grupo sem câncer, esse gênero tem sido relatado por ter uma aparente relação sinérgica com *Streptococcus*, que também pertencente ao mesmo filo bacteriano. Existem relatos na literatura de pacientes diagnosticados com câncer de pulmão que tiveram um enriquecimento nas vias aéreas inferiores com bactérias orais comensais destes dois gêneros (*Veillonella* e *Streptococcus*), que possuem associação com a regulação positiva das vias de proliferação da quinase regulada por sinal extracelular (*ERK*) e fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*). Além desta associação, experimentos *in vitro* confirmaram estes mecanismos, expondo células epiteliais das vias aéreas a algumas destas bactérias¹⁵⁴. Essa relação de cooperação entre estes gêneros pode se dar pelo fato do *Streptococcus*, que é um gênero de bactérias anaeróbicas facultativas, terem a capacidade de fermentar açúcares gerando lactato, que por sua vez pode ser fermentado em seguida por espécies de *Veillonella* que produzem propionato, acetato, CO² e H²¹⁵⁵.

Para melhor compreender os possíveis efeitos biológicos de toda a composição de gêneros bacterianos, utilizamos o algoritmo *LEfSe*, que tem a capacidade de identificar características genômicas que mais destaquem as diferenças entre duas condições biológicas comparadas, com base na diferença estatística, consistência biológica e relevância do efeito¹¹⁹. Conforme pode ser observado na Figura 20, identificamos 19 gêneros diferencialmente abundantes, classificados pela análise discriminante linear (LDA), combinada com medidas de tamanho de efeito (*LEfSe*), sendo 8 no grupo AdG: *Actinobacillus*, *Selenomonas*, *Johsonella*, *Atopobium*, *Abiotrophia*, *F0058*, *Cardiobacterium* e *Family XIII UCG 001*. Já para o grupo controle endoscópico identificamos 11 gêneros: *Neisseria*, *Selenomonas*, *Eikenella*, *Peptococcus*, *Lautropia*, *Prevotella 2*, *Bifidobacterium*, *Mycoplasma*, *Odoribacter*, *Kingella* e *Eubacterium yurii group*

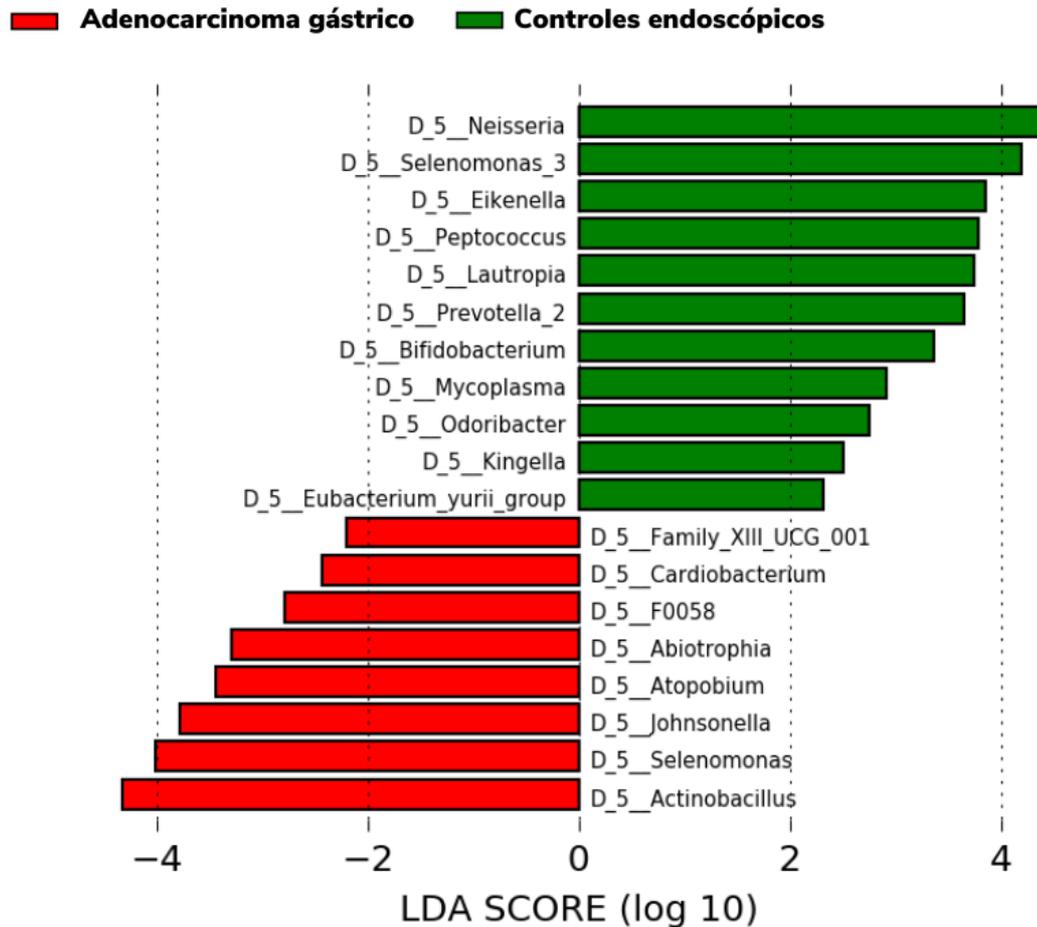


Figura 20 - Análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (*LEfSe*) entre casos e controles. *Nota.* Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos nos testes de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon* aos pares. Para LDA foi considerado um limite de pontuação logarítmica de $\geq 2,0$.

Actinobacillus é um gênero do filo *Proteobacteria* relatado como um gênero bacteriano que pode contribuir para a inflamação persistente em paciente com gastrite atrófica e metaplasia, mesmo após 1 ano de erradicação da *H. pylori* ¹⁵⁶. Já as *Selenomonas* são gêneros bacterianos provenientes do filo *Firmicutes* e da família *Selenomonadaceae*, que foram identificados pela primeira vez por Miller em 1887 ¹⁵⁷. Espécies como as *Selenomonas sputigena* ATCC 35185 provenientes desse gênero, foram identificadas em um trabalho que avaliou amostras da túnica lingual (película de biofilme presente no dorso lingual) de 115 pacientes com câncer gástrico, sendo que estes microrganismos foram mais frequentes nas amostras (N=27) de túnica com característica branca e fina ¹⁵⁸. Outro estudo publicado esse ano (2021), avaliou 47 amostras de mucosa gástrica e observou um aumento contínuo, dos gêneros *Selenomonas*, *Slackia*, *Bergeyella*, e *Capnocytophaga*, entre indivíduos com gastrite superficial até a transição para câncer gástrico ¹⁵⁹. Vale ressaltar que essa é mais uma evidência mostrando um enriquecimento de gêneros provenientes da cavidade oral, no

estômago. No grupo controle identificamos também um outro gênero *Selenomonas*, porém uma OTU diferente, a *Selenomonas_3*. Essas diferenças ainda não são muito bem descritas na literatura, dificultando a compreensão de possíveis mecanismos associados à saúde ou doença, sendo necessárias ainda análises a nível de espécie para elucidar melhor essas relações. Neste sentido estamos trabalhando na padronização de um PCR pentaplex que permite a análise simultânea por sequenciamento de 5 regiões distintas dos 16S rRNA, possibilitando uma melhor identificação das bactérias, até mesmo a nível de espécie ¹⁶⁰.

No grupo controle endoscópico destacamos a presença do gênero *Neisseria*, o qual apresentou um LDA acima de 4. Esse gênero já foi descrito aqui anteriormente como uma bactéria redutora de nitrato. Nesse contexto, esse gênero tem sido associado a indivíduos saudáveis livres de doenças bucais e a dietas ricas em nitratos provenientes de vegetais, que podem ter um efeito benéfico ao causar rápidas mudanças estruturais e funcionais na comunidade microbiana oral, atuando assim como um modulador de bactérias orais benéficas ^{161,162}. Corroborando com isso alguns trabalhos ^{163,164} têm demonstrado que a intervenção com bebidas a base de vegetais (consequentemente rica em nitrato de origem natural) impacta no aumento da abundância oral de *Neisseria* e *Rothia*. Vale ressaltar que muito se discute do papel maléfico dos nitratos industriais adicionados a produtos ultraprocessados, e mais especificamente do nitrito, seu subproduto gerado a partir da fermentação bacteriana que pode formar compostos N-nitrosos. Porém, isso acontece em condições associadas a carnes processadas, como embutidos. Nas frutas e vegetais, que geralmente são as maiores fontes de nitrato da dieta, a sinergia desses compostos com os antioxidantes previne a formação de compostos N-nitrosos e estimula a conversão do nitrato em óxido nítrico ¹⁶², composto extremamente benéfico para a saúde cardiovascular. Sendo assim, talvez um perfil de dieta mais rico em fibras e antioxidantes abundantes nos alimentos *in natura*, estejam levando a uma maior abundância da *Neisseria* em nosso grupo controle endoscópico. A abundância relativa de cada gênero citado acima pode ser observada nas figuras 21 e 22.

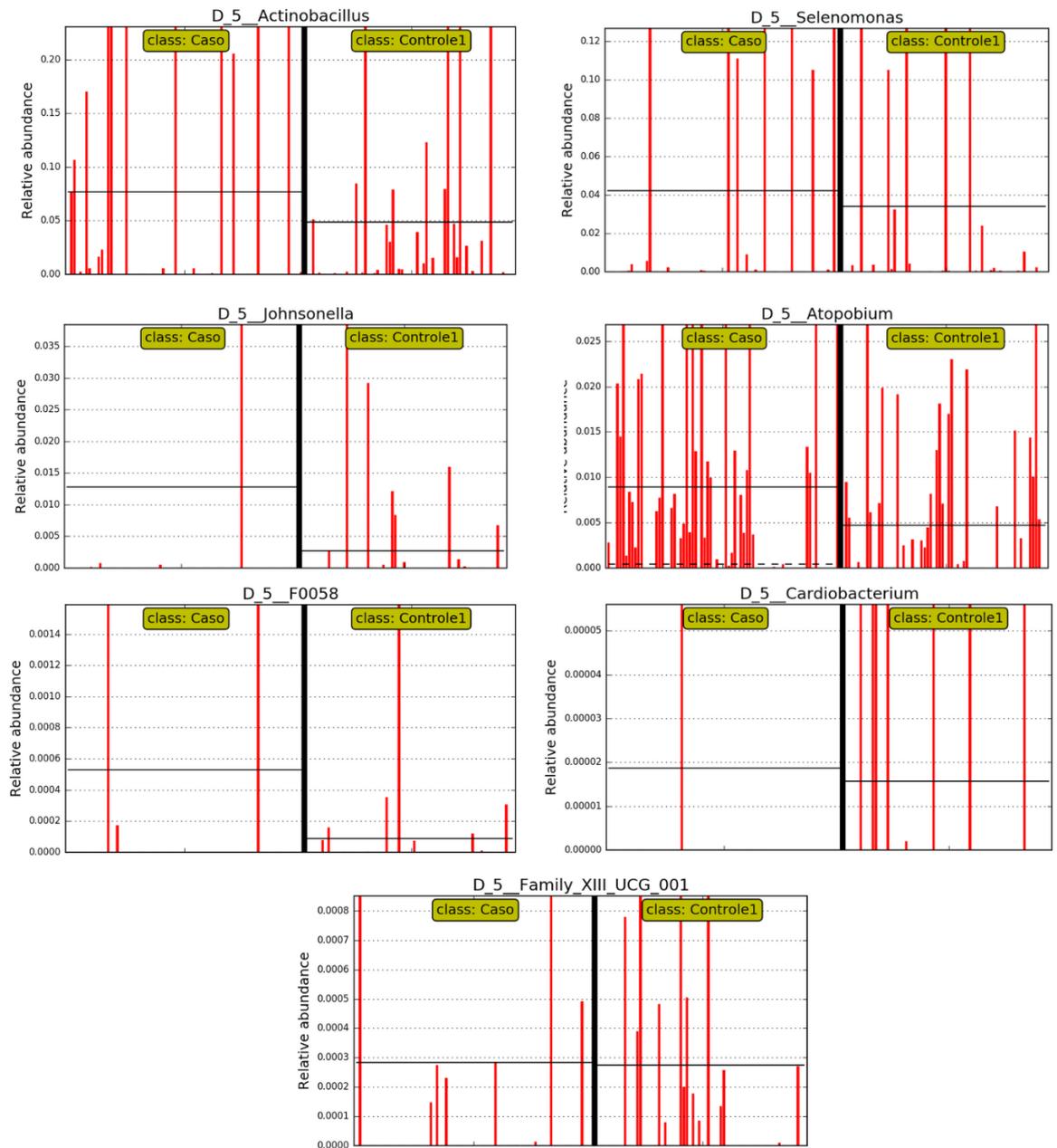


Figura 21 - Abundância relativa de gêneros diferencialmente abundantes, identificados na análise por *LEfSe* no grupo AdG. **Nota.** As linhas retas na horizontal dos painéis indicam as médias do grupo e as linhas pontilhadas indicam as medianas do grupo.

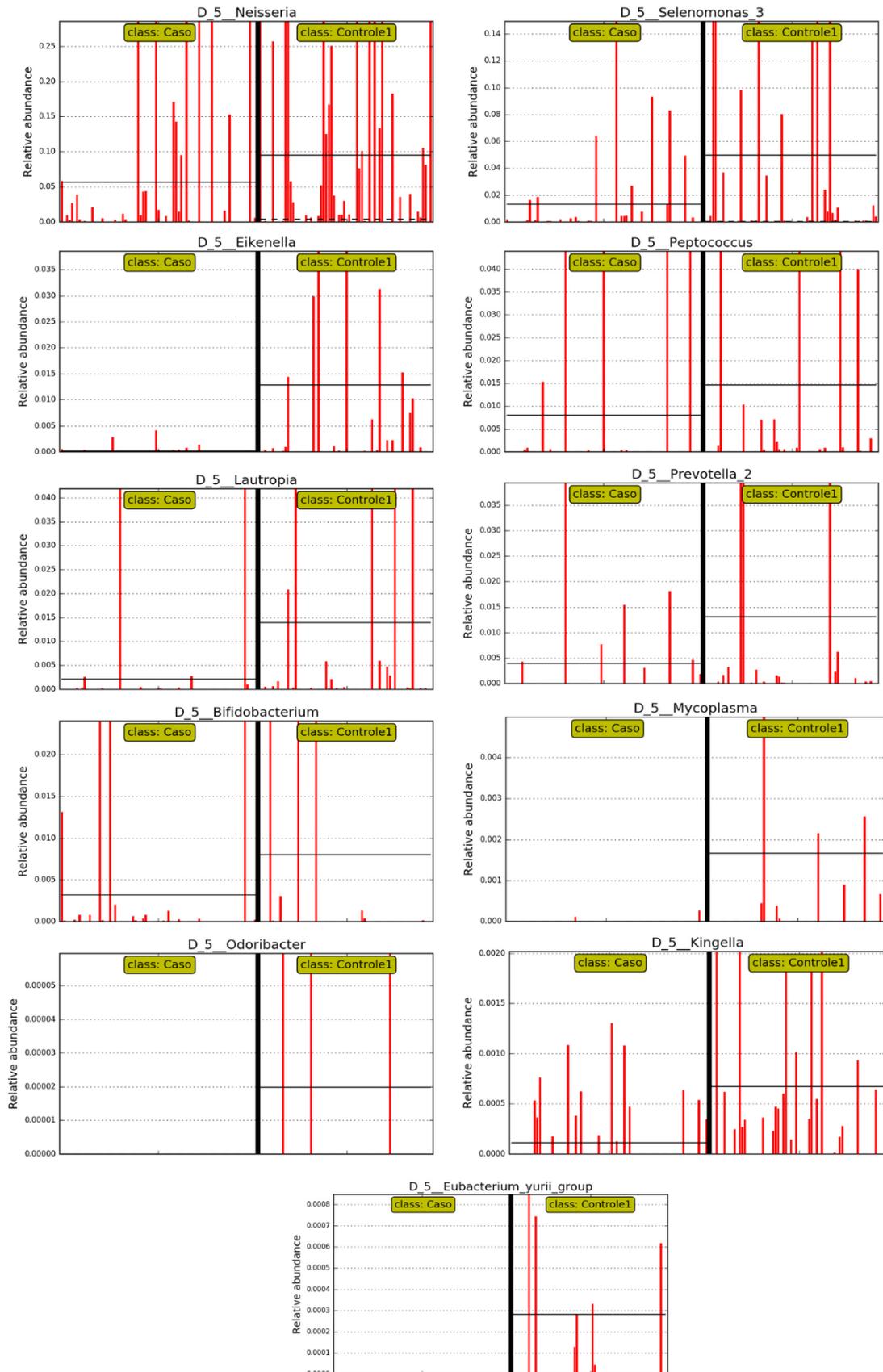


Figura 21 - Abundância relativa de gêneros diferencialmente abundantes, identificados na análise por LEfSe no grupo controle endoscópico. *Nota.* As linhas retas na horizontal dos painéis indicam as médias do grupo e as linhas pontilhadas indicam as medianas do grupo.

Para melhor compreender os aspectos da diversidade entre as amostras, realizamos análises de diversidade alfa e beta. Em caráter de definição e de contextualização, vale ressaltar que cada métrica avaliada considera um parâmetro para identificar um resultado. Nesse contexto, na diversidade alfa, o índice *Observed* avalia somente o número de bactérias na amostra, enquanto que os índices *Shannon* e *Simpson* consideram tanto o número de bactérias presentes, como sua abundância^{165,166}. A diversidade beta analisa diferenças tanto qualitativas, quanto quantitativas de toda a extensão das duas ou mais comunidades bacterianas comparadas, em nosso caso o grupo controle endoscópico e o grupo AdG. Dentre as métricas utilizadas temos a de *Bray-Curtis*, e distâncias *UniFrac (unweighted e weighted)*. *Bray-Curtis* é um índice que avalia a similaridade da composição microbiana, tendo como premissa a abundância ou quantidade de *reads*, enquanto que as distâncias *UniFrac* avaliam quão próximas são as bactérias dentro da classificação filogenética. O índice *unweighted* utiliza apenas a distância filogenética/taxonômica entre os microorganismos, já a *weighted* considera a abundância entre essas bactérias¹⁶⁷.

Conforme pode ser visto na Figura 23 e Tabela 11, temos uma diversidade alfa maior no grupo controle endoscópico, com todas as 3 métricas utilizadas (*Observed*, *Shannon* e *Simpson*). De forma geral, isso representa uma maior riqueza bacteriana (número de bactérias) e abundância (distribuição/frequência) neste grupo. Na diversidade beta identificamos que casos e controles não são similares, evidenciado pelas 3 métricas avaliadas (*Bray-Curtis*, $p < 0,001$), (*UniFrac unweighted*, $p < 0,001$) e (*UniFrac weighted*, $p < 0,001$), ou seja, as bactérias entre esses grupos, possuem uma distância e abundância diferentes dentro da classificação taxonômica, sugerindo diferentes estruturas da comunidade microbiana (Figura 24).

Um estudo publicado em 2019¹⁶⁸, recrutou 67 pacientes com diagnóstico de carcinoma esofágico de células escamosas e 36 pacientes com adenocarcinoma gástrico localizado na cárdia, fez a avaliação por rRNA 16S da região V4 do DNA bacteriano proveniente de biópsias tumorais e não-tumorais pareadas. Os autores identificaram que nos indivíduos com câncer gástrico o tecido tumoral apresentou uma maior diversidade alfa, quando comparado ao tecido não tumoral (4.3 *versus* 2.0; $P = 0,00055$). Nos indivíduos com câncer de esôfago, os autores não identificaram uma diferença na diversidade alfa do tecido tumoral *versus* não tumoral. Já no quesito diversidade beta, para o índice *weighted* foi identificada uma diferença entre os tecidos tumorais e não tumorais nos indivíduos com câncer de esôfago, mas não para o índice *unweighted*. Já para os indivíduos com câncer gástrico os tecidos tumorais e não-tumorais apresentaram uma diversidade beta distinta. Um

ponto interessante, é que embora eles não tenham avaliado a biópsia de indivíduos saudáveis, já foi possível encontrar diferenças importantes. Embora no presente estudo estejamos avaliando lavado gástrico, que pode ter um perfil mais transitório em relação a comunidade bacteriana residente no tecido gástrico, possivelmente o perfil desse suco gástrico pode ter uma relação com o tecido gástrico propriamente dito, ou até com a microbiota fecal e salivar destes sujeitos.

Virinder Sarhadi et al.¹⁶⁹ realizaram o sequenciamento do DNA fecal de indivíduos Finlandeses, sendo: 29 adenocarcinomas gástricos, 23 tumores estromais gastrointestinais e 13 controles saudáveis. Não foi identificada uma diferença significativa para o índice de *Shannon* entre os grupos câncer *versus* controle. No entanto, vressaltar que o pequeno número de indivíduos avaliados é uma limitação importante deste estudo. Ainda avaliando tecidos, outro trabalho avaliou uma coorte de 276 indivíduos diagnosticados com câncer gástrico e que não realizaram quimioterapia pré-operatória tiveram 3 tipos de amostras coletadas durante a gastrectomia (tecido normal, tecido tumoral e tecido adjacente ao tumor). Os autores fizeram a comparação da microbiota de 229 amostras de tecido tumoral, 247 de tecido adjacente (2 a 5 cm do tecido tumoral) e 230 tecidos normais (>5 cm adjacente ao tecido tumoral). Eles identificaram uma diversidade alfa maior no tecido normal, pelo índice de *Observed*, quando comparado com o tecido tumoral e adjacente ($p=0,000$). Para *Shannon* e *Simpson* a diversidade foi maior no tecido normal *versus* adjacente. Para a diversidade beta não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos¹⁷⁰.

Vale ressaltar que essas variações e heterogeneidade de resultados encontrados na literatura e em nosso projeto, podem estar relacionadas com uma série de fatores que impactam em sua diversidade, como evidenciado por um estudo extremamente relevante proveniente do Consórcio de Microbioma Humano¹⁷¹, o qual avaliou 4.788 amostras de diversos tecidos/locais (saliva, fezes, vagina) de 242 adultos sem doença. Foi evidenciado que, embora a diversidade tenha uma relação com a dieta, o ambiente, a genética do hospedeiro e com a exposição microbiana precoce, essa diversidade varia muito e está muito ligada ao tipo de nicho, ou seja, a área/tecido que estão sendo avaliados.

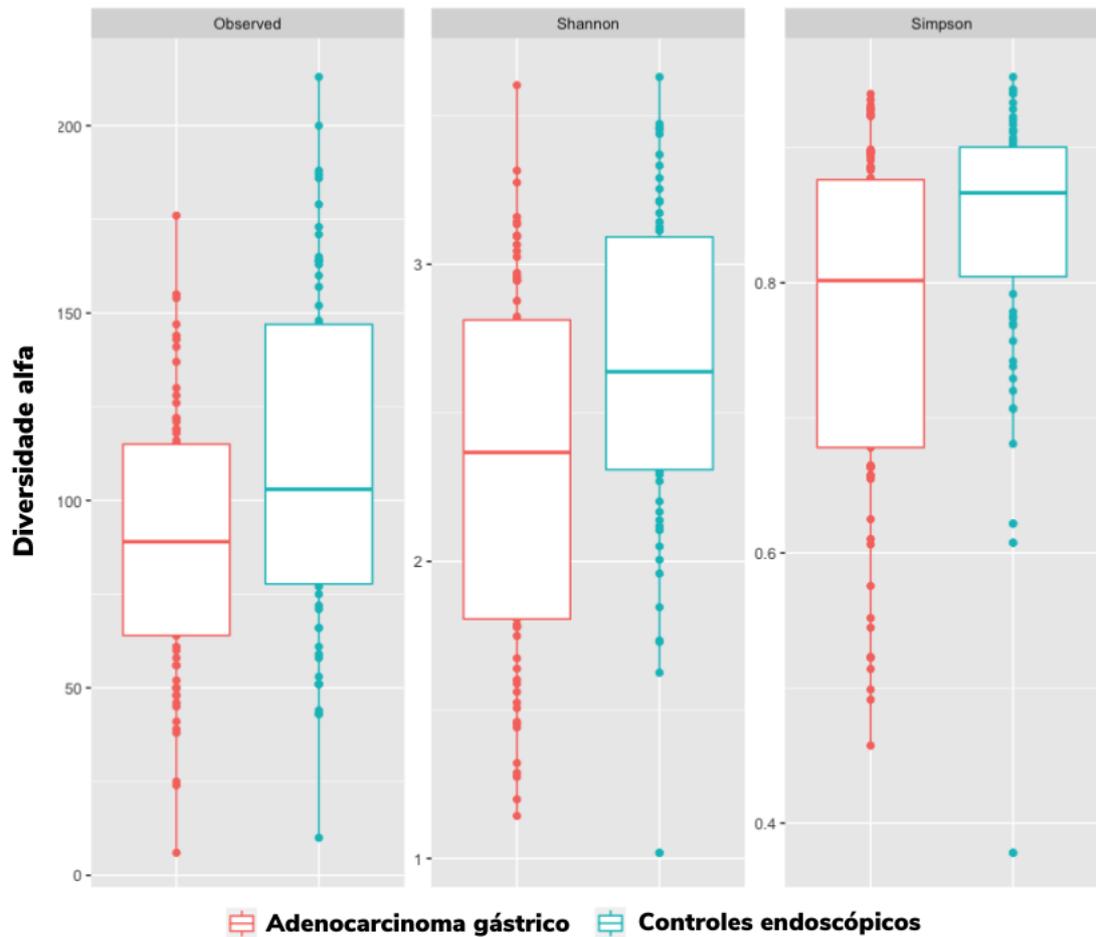


Figura 22 - Medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico entre casos com adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos.

Tabela 13 - Avaliação da diversidade alfa entre os grupos casos e controles.

Métricas	Grupos	N	Média (DP)	Mediana (min – max)	P valor
<i>Observed</i>	Adenocarcinoma gástrico	77	90,19 (34,34)	89 (6,00-176,00)	0,002
	Controles endoscópicos	68	111,59 (45,78)	103,00 (10,00-213,00)	
<i>Shannon</i>	Adenocarcinoma gástrico	77	2,32 (0,60)	2,37 (1,14-3,60)	<0,001
	Controles endoscópicos	68	2,65 (0,53)	2,64 (1,02-3,63)	
<i>Simpson</i>	Adenocarcinoma gástrico	77	0,77 (0,13)	0,80 (0,46-0,94)	<0,001*
	Controles endoscópicos	68	0,84 (0,10)	0,87 (0,38-0,95)	

Nota. Teste T. * Teste não paramétrico U de Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

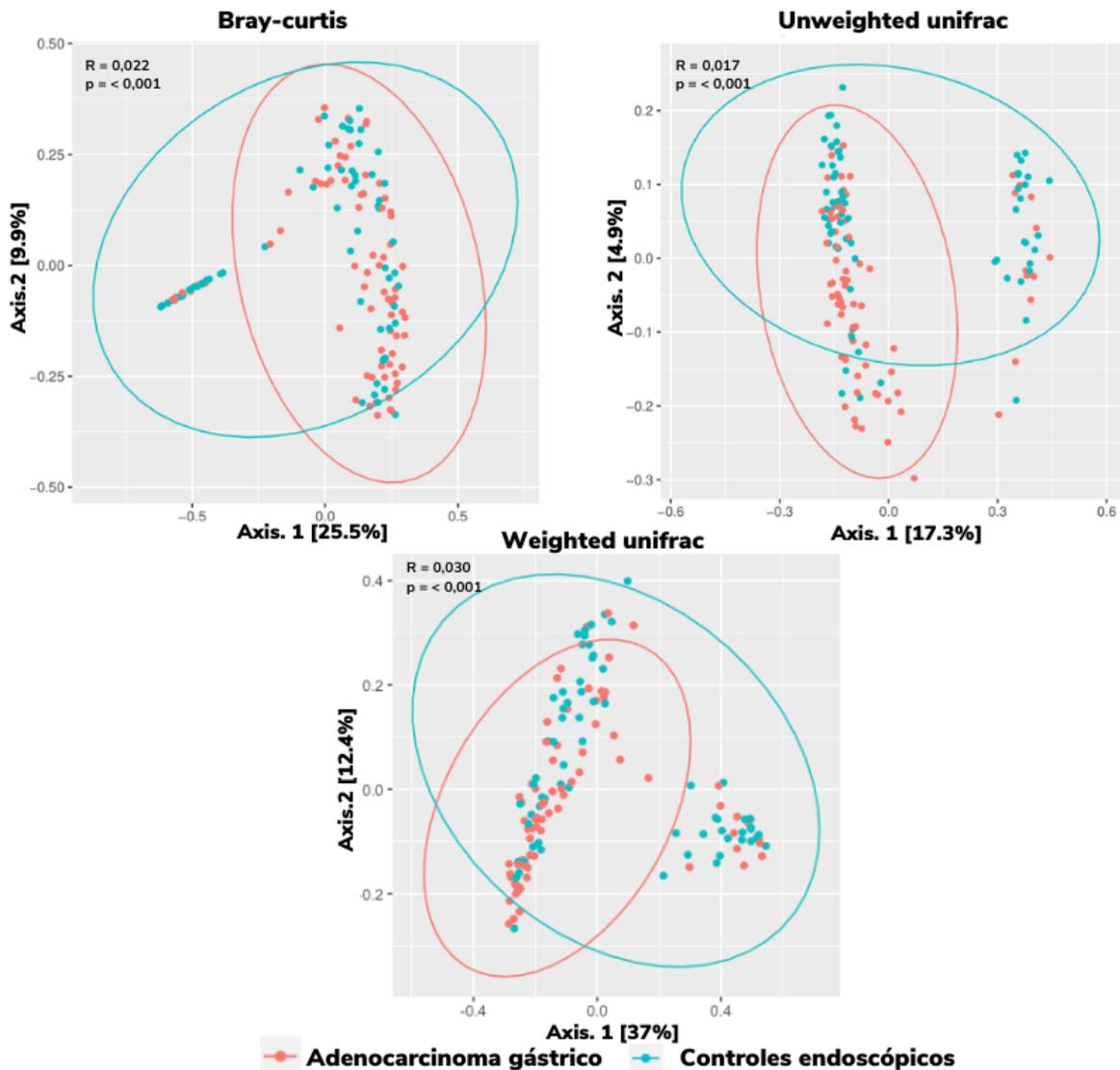


Figura 23 - Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico entre casos com Adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos. **Nota.** O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Estratificamos nossa análise de diversidade alfa e beta pelo tipo de achado endoscópico, considerando sempre que os controles com exame normal/gastrite superficial possuem um tamanho amostral suficiente ($N=50$) para comparar com o grupo AdG. Conforme figura 25A, identificamos uma diversidade alfa maior no grupo controle com menor nível de inflamação epitelial quando comparado com o AdG em todas as métricas avaliadas (*Observed*, t -test $p = 0,001$), (*Shannon*, t -test $p = <0,001$) e (*Simpson*, *Wilcoxon test*, $p = <0,001$). Para a diversidade beta também foi identificado que esses dois grupos não são similares (Figura 24a). Esses resultados corroboram e sustentam uma diferença importante de diversidade total entre grupo com e sem câncer gástrico, relatada aqui anteriormente. Também

comparamos os controles com gastrite crônica/atrófica *versus* controles com metaplasia intestinal para essas métricas de diversidade, mas não identificamos diferença estatística (Figura 25B e 26B). Em amostras fecais de animais existem relatos de um baixo índice de *Shannon* e alto de *Simpson* nos grupos de gastrite não-atrófica crônica, gastrite atrófica crônica, lesão pré-cancerosa de câncer gástrico (metaplasia intestinal) e câncer gástrico, sempre quando comparado com o grupo controle sem câncer e sem qualquer tipo de alteração epitelial ¹⁷². Embora em nosso trabalho não conseguimos comparar separadamente todos os controles com um grau mais severo de alteração epitelial *versus* o grupo com câncer, devido ao limitado tamanho amostral, que poderia assim limitar o poder estatístico, isso não significa que não exista uma diferença ou uma modificação no perfil de microbiota gástrica ao longo dos diferentes níveis de inflamação gástrica. Dessa forma, no futuro esse tamanho amostral será expandido para uma melhor compreensão desses resultados.

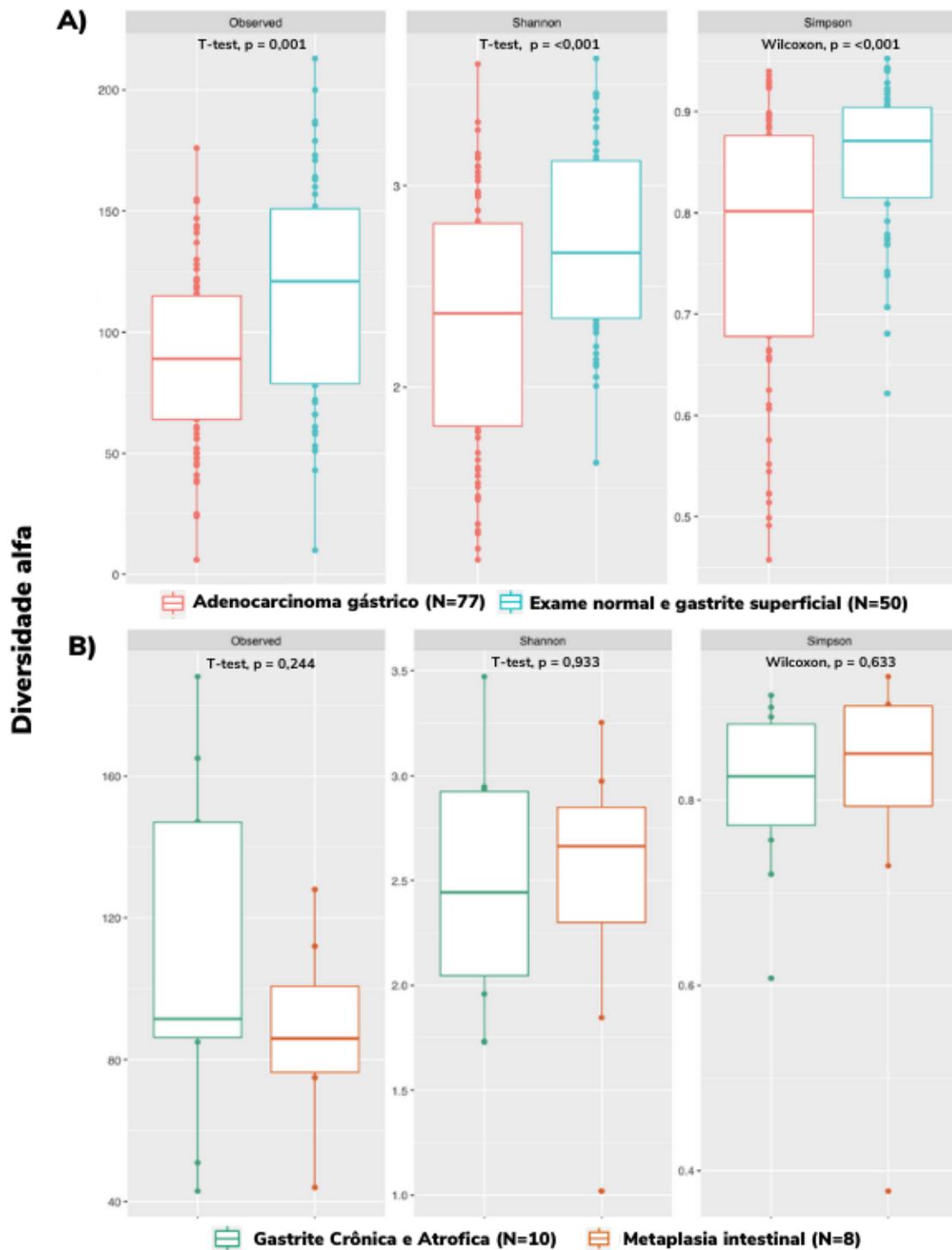


Figura 24 - Medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico entre casos com adenocarcinoma gástrico e controles estratificados pelos achados endoscópicos (resultado da endoscopia digestiva alta). **Nota.** A) Comparação entre grupos AdG *versus* controles com epitélio gástrico normal/gastrite superficial. B) Comparação entre os grupos controles com gastrite crônica/atrófica *versus* controles com metaplasia intestinal. Após testar a normalidade dos dados, foram utilizados os testes de Teste T e Kruskal-wallis. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

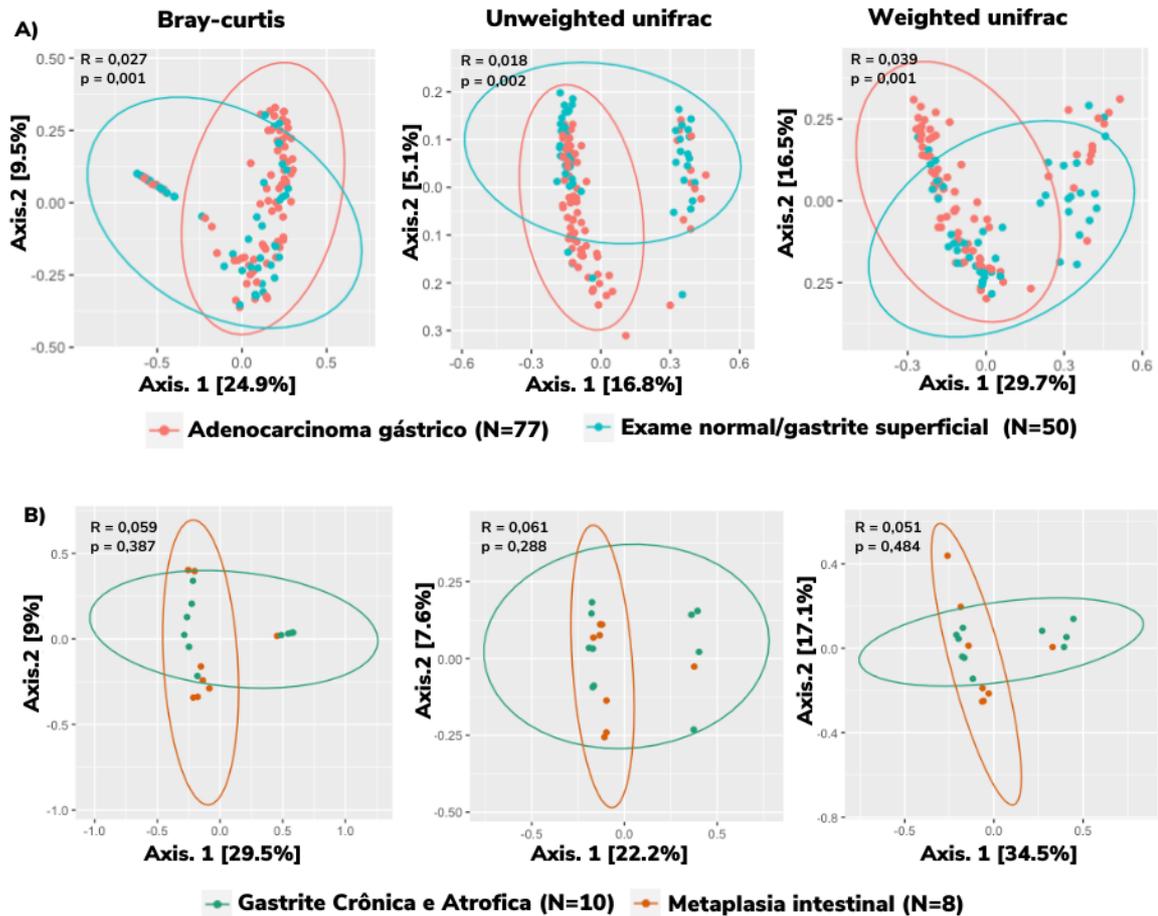


Figura 25 - Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico entre casos com adenocarcinoma gástrico e controles estratificados pelos achados endoscópicos (resultado da endoscopia digestiva alta). **Nota.** A) Comparação entre grupos AdG *versus* controles com epitélio gástrico normal/gastrite superficial. B) Comparação entre os grupos controles com gastrite crônica/atrófica *versus* controles com metaplasia intestinal. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Com bases nessas diferenças importantes encontradas anteriormente entre o grupo AdG e controles com exames normal/gastrite superficial (Figura 25A e 26A), repetimos a análise por *Lefse*, considerando nos grupos controles somente esses indivíduos (N=50) e segregando os sujeitos com alguma alteração epitelial mais severa. Assim, podemos observar na figura 27 que fazendo essa nova comparação ampliamos os gêneros diferencialmente abundantes entre os grupos agora comparados, visto que como observado anteriormente, o grupo mais próximo a uma cavidade gástrica normal é o mais distinto do grupo com AdG, em termos de diversidade total, tanto alfa quanto beta. Foram identificados 23 gêneros mais frequentes nos controles sem câncer, com destaque para: *Prevotella 7*, *Porphyromonas*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium* e *Eubacterium nodatum group*, que apresentaram um LDA maior. As bactérias do gênero *Porphyromonas* são estritamente anaeróbias e patogênicas

sendo que este gênero foi evidenciado como o mais abundante no grupo controle com exame normal/gastrite superficial, sendo a espécie *Porphyromonas gingivalis* muito estudada por ser uma bactéria que medeia a resposta inflamatória local da periodontite ^{173,174}.

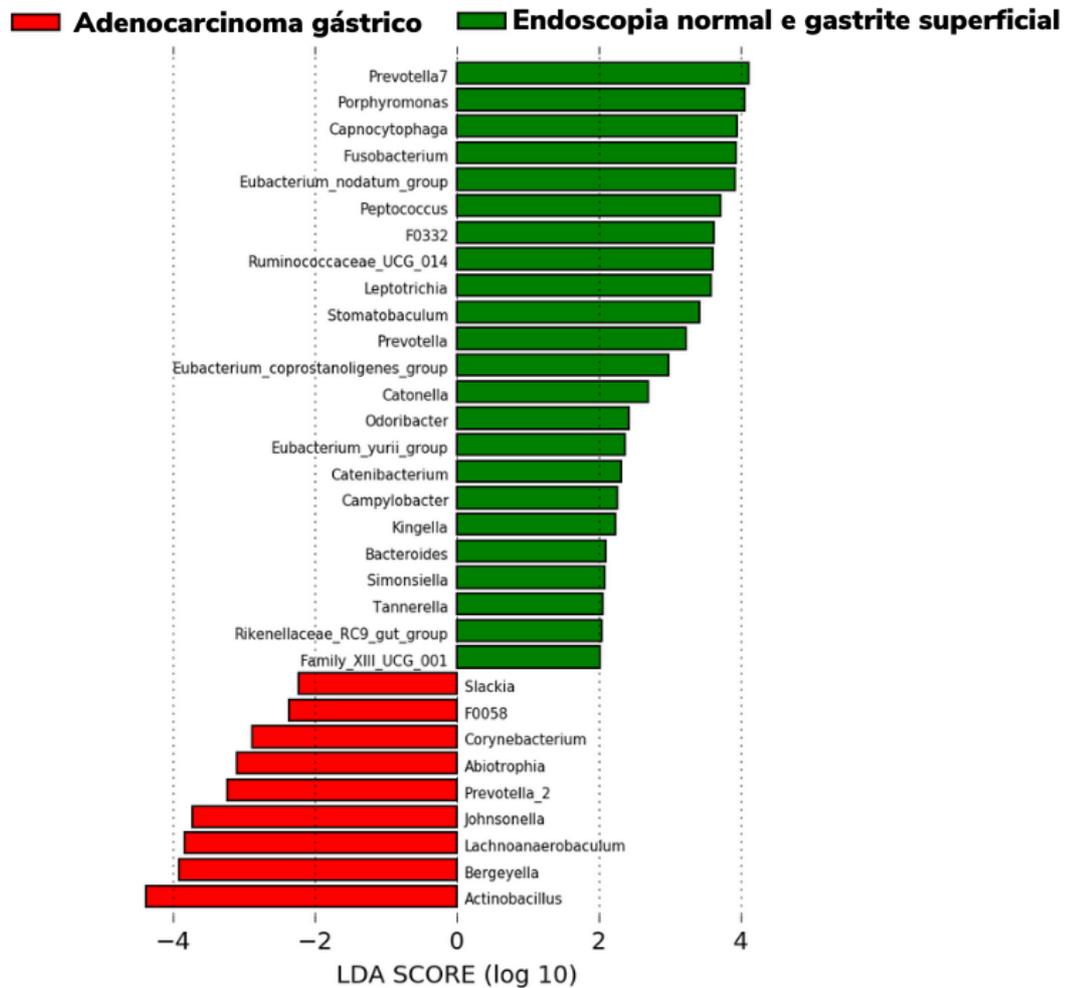


Figura 26 - A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (*LEfSe*) entre os indivíduos com câncer e subgrupo dos controles que possuem exame normal ou com gastrite superficial na endoscopia. *Nota.* Um valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos nos testes de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon* aos pares. Para LDA foi considerado um limite de pontuação logarítmica de ≥ 2.0 .

No grupo AdG identificamos 9 gêneros mais abundantes, sendo *Actinobacillus*, *Bergeyella*, *Lachnoanaerobaculum* e *Johnsonella* os que apresentaram uma diferença maior. Um ponto interessante é que embora o gênero *Slackia* tenha apresentado um LDA menor, esse gênero pode ter uma ligação importante com a dieta desses indivíduos, pois algumas de suas espécies têm sido descritas como bactérias capazes de metabolizar a daidzeína, uma isoflavona conhecida por ser um composto bioativo), muito presente na soja. Essas isoflavonas sofrem ação das enzimas β -glicosidase que hidrolisam os glicosídeos de isoflavonas em agliconas,

que posteriormente a nível intestinal são fermentados por bactérias predominantemente anaeróbicas gerando o equol, um metabólito muito estudado devido aos seus efeitos na estimulação da resposta ao estrogênio e por ter uma grande capacidade antioxidante ^{175,176,177}. Vale ressaltar que essa conversão só acontece em 20 a 30% dos adultos que consomem soja, sendo que essa variação interindividual tem sido relacionada principalmente com a composição da microbiota. Como comentado anteriormente, essa metabolização das isoflavonas é essencial para os processos de absorção e biodisponibilidade, impactando então diretamente na função que este metabólito irá exercer ¹⁷⁸. Nesse contexto, os flavonóides são os fitoquímicos mais abundantes em dietas ricas em frutas, vegetais, leguminosas e dietas também ricas em fibras. Existem especulações que dietas altas em fibras podem diminuir a biodisponibilidade dos flavonóides por aprisionamento físico na matriz alimentar, ou até por diminuir muito o tempo de trânsito intestinal, porém, isso não é totalmente comprovado e é extremamente variável, visto que pode depender do tipo da fibra ingerida ^{179,180,181}. Porém, com o avanço do estudo da microbiota, sabe-se que a geração de ácidos graxos de cadeia curta a nível intestinal pode melhorar a biodisponibilidade e o metabolismo dos flavonóides no intestino grosso ¹⁸². Isso corrobora com os achados de Mustafa et al. ¹⁸³ que testaram o efeito de carboidratos comerciais (glicose e sacarose) e de fibras prebióticas (inulina e frutooligossacarídeos) no impacto da produção de equol a partir do leite de soja, fermentadas por duas espécies de *Bifidobacterium*. Os autores identificaram que todos os prebióticos tiveram efeito significativo na produção de equol, mas a inulina exibiu o maior nível de produção de equol em comparação com os frutooligossacarídeos. Vale ressaltar que a maior presença de *Slackia* também parece estar associada em indivíduos saudáveis com a ingestão de produtos fermentados ¹⁸⁴ e *in vitro* a fermentação da fibra de mamão verde demonstrou aumentar a abundância desse gênero ¹⁸⁵. Embora historicamente as evidências e mecanismos descritos acima aconteçam de forma predominante no intestino grosso, em nosso trabalho mostramos que no grupo AdG, existe algum fator que parece influenciar uma maior abundância desse gênero, onde talvez a dieta tenha um papel importante. Um ponto importante pensando na digestão como um processo contínuo, é que, na mastigação o alimento se mistura com a saliva, que possui enzimas como as glicosidases, que realizam a hidrólise de alguns flavonóides em O-glicosídeos e que nesse processo contínuo, quando esse bolo alimentar chega ao estômago, já em um tamanho reduzido, possibilita uma liberação de flavonóides ^{186, 187,188}. Com isso, acreditamos que a matriz alimentar e a sinergia entre os nutrientes pode impactar o perfil de alguns gêneros bacterianos. No módulo 3 deste trabalho faremos um melhor aprofundamento desta discussão.

Dessa forma, podemos compreender que nesse segundo módulo identificamos diferenças promissoras na microbiota gástrica entre casos AdG e controles endoscópicos. Sendo que a presença de bactérias orais com perfil mais pró-inflamatório parece ser um fator importante no que se refere a diferenças entre os grupos, visto que esses gêneros são mais presentes no grupo com AdG. Serão necessários mais estudos, incluindo por exemplo a avaliação do bacterioma de amostras de biópsias gástricas, para compreender se essas bactérias são residentes ou transientes. Embora tenhamos também identificado algumas bactérias potencialmente patogênicas no grupo controle endoscópico normal/gastrite superficial, discutimos que a literatura já estabeleceu que diversos fatores podem influenciar a composição e a função biológica da microbiota, e que provavelmente no grupo sem câncer a presença de bactérias associadas à saúde possa gerar uma interação ou competição com os gêneros patogênicos que condiciona uma modificação em toda dinâmica nesse ecossistema, diferenciando então os controles endoscópicos os casos com câncer.

4.2 DIFERENÇAS ENTRE OS INDIVÍDUOS COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS

Nos indivíduos do grupo AdG (N=177), realizamos análises estratificando os pacientes por variáveis clínicas. Dentre elas, selecionamos 174 sujeitos que possuíam a classificação histológica de *Lauren*¹⁰ completa, sendo, 42 difusos, 24 intestinal e 8 mistos. Na diversidade alfa evidenciamos uma diferença estatística nas métricas de *Shannon* e *Simpson* (Figura 28). Em ambos a diversidade é maior nos indivíduos com subtipo histológico difuso e intestinal, quando comparado com o misto. Um resultado similar também foi identificado na diversidade beta, nas 3 métricas avaliadas (*Bray-Curtis*, $p=0,185$), e distâncias *UniFrac* (*Unweighted*, $p=0,066$) (*Weighted*, $p=0,102$), mostrando que esses grupos são similares e com isso, a diversidade total não se difere por essa variável. Porém, esses resultados podem estar sendo influenciados pelo tamanho amostral limitado dos indivíduos do tipo misto. Para melhorar essa distribuição, testamos o subtipo difuso (N = 42) *versus* os demais (N = 32) e identificamos 7 gêneros que mais explicam essas diferenças histológicas em nossas amostras (Figura 29). No subtipo difuso - *Porphyromonas* e *Abiotrophia*; Intestinal - *Alloprevotella*, F0058 e *Pseudomonas*; Misto - *Eubacterium nodatum group* e *Prevotella* 6. Nesse contexto, vale ressaltar que para o subtipo difuso, os fatores etiológicos e o tipo de lesão pré-neoplásica ainda não são muito bem definidos como no subtipo intestinal, que sabidamente é mais

associado com a metaplasia intestinal prévia e infecção por *H. pylori*¹⁸⁹. Nesse sentido, ressaltamos o gênero *Porphyromonas* que apresentou um LDA de 4 no subtipo difuso, que nos indica uma maior possibilidade dessa bactéria ter um efeito biológico importante nesses indivíduos. Esse gênero é amplamente descrito por estar ligado a quadros que envolvem inflamação na cavidade oral como na periodontite, inclusive tem sido considerado um importante biomarcador do câncer da cavidade oral^{190,191,192}, além de terem sido descritos também em outros tipos de câncer, como o de pâncreas e gástrico^{193,194}. A espécie *Porphyromonas gingivalis* é a espécie mais descrita deste gênero bacteriano, e algumas características como a interação com o lipopolissacarídeo localizado na membrana celular dessa bactéria, podem desencadear a translocação de *NF-kB* para o núcleo, gerando a produção de citocinas inflamatórias, como *IL-1a*, *IL-1b*, *IL-6*, *IL-8*; além de induzir a superexpressão de metaloproteinases, através das vias *ERK1 / 2-ETS1*, *p38 / HSP27* e *PAR / NF-kB*, mecanismos esses que podem estar relacionados ao seu potencial carcinogênico^{192,195}. Mais estudos são necessários para elucidar se essa bactéria, em conjunto com outros fatores, pode ser um biomarcador do subtipo difuso.

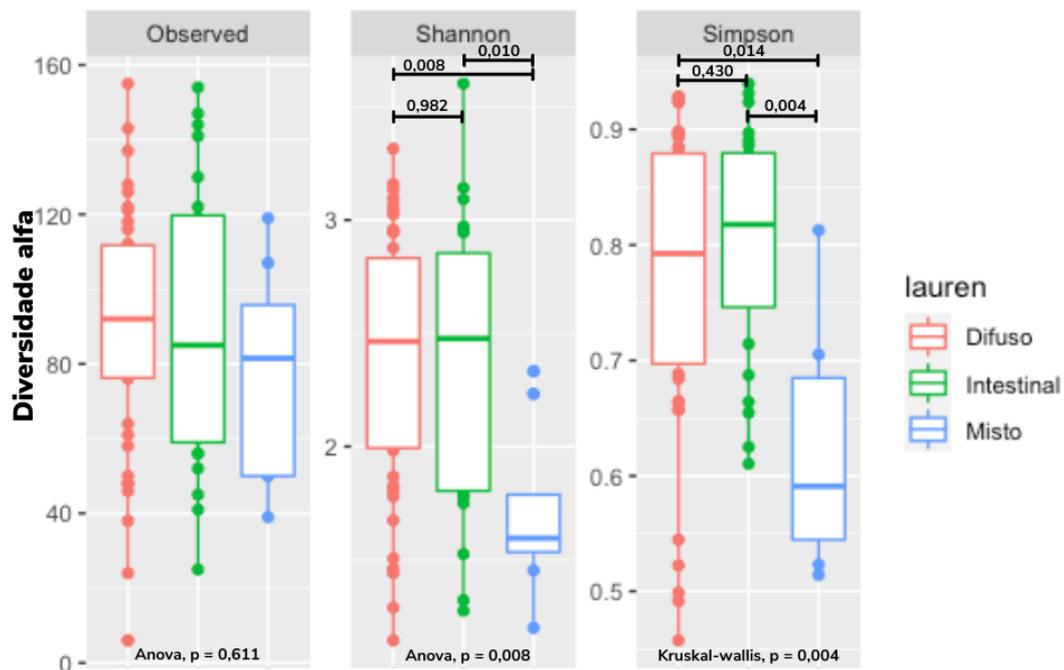


Figura 27 - Medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico de indivíduos do grupo AdG, estratificado pela classificação histológica de Lauren. **Nota.** Após testar normalidade dos dados, foram utilizados os testes de Anova e Kruskal-Wallis. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

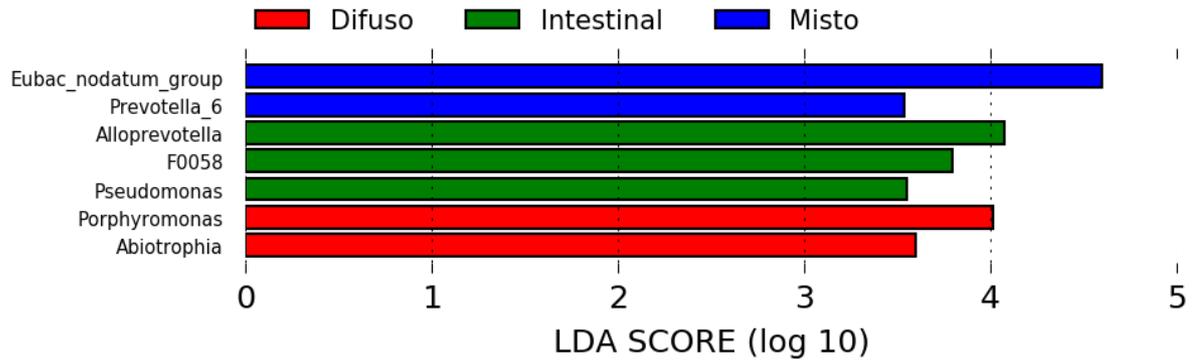


Figura 28 - A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (*LEfSe*) entre os indivíduos com câncer estratificado pelo subtipo histológico de Lauren. **Nota.** Um valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos nos testes de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon* aos pares. Para LDA foi considerado um limite de pontuação logarítmica de ≥ 2.0 .

Em termos de estadiamento da doença, 58 casos tinham doença localizada e 18 metastática ao diagnóstico. Dessa forma, também verificamos aspectos de diversidade total, e também existe diferença nos grupos para diversidade alfa *Observed* (t-test $p = 0,147$), *Shannon* (t-test $p = 0,520$) e *Simpson* (*Wilcoxon test*, $p = 0,995$). Já para diversidade beta evidenciamos uma não similaridade entre os grupos *Bray-Curtis* ($p=0,010$), e distâncias *UniFrac Unweighted*, ($p=0,016$) *Weighted* ($p=0,023$) (Figura 28). A nível de gênero as *Pseudomonas*, que são provenientes do filo *Proteobacteria*, mostraram-se enriquecidas nos indivíduos metastáticos (Figura 29). Algumas espécies desse gênero já foram relatadas por terem seu DNA inserido no genoma humano em amostras de adenocarcinoma gástrico, no processo de transferência horizontal de genes, próximo a regiões regulatórias de quatro protooncogenes¹⁹⁶. Vale ressaltar que essas mutações podem ter um papel carcinogênico, tanto quanto as que ocorrem com outros agentes químicos já conhecidos pelo seu potencial carcinogênico. Embora esse gênero tenha apresentado um LDA relativamente baixo, seria importante investigar seu papel em pacientes metastáticos em futuros estudos que tenham uma amostra maior, para compreender se esse resultado é representativo e também aprofundar no impacto na progressão tumoral desses indivíduos.

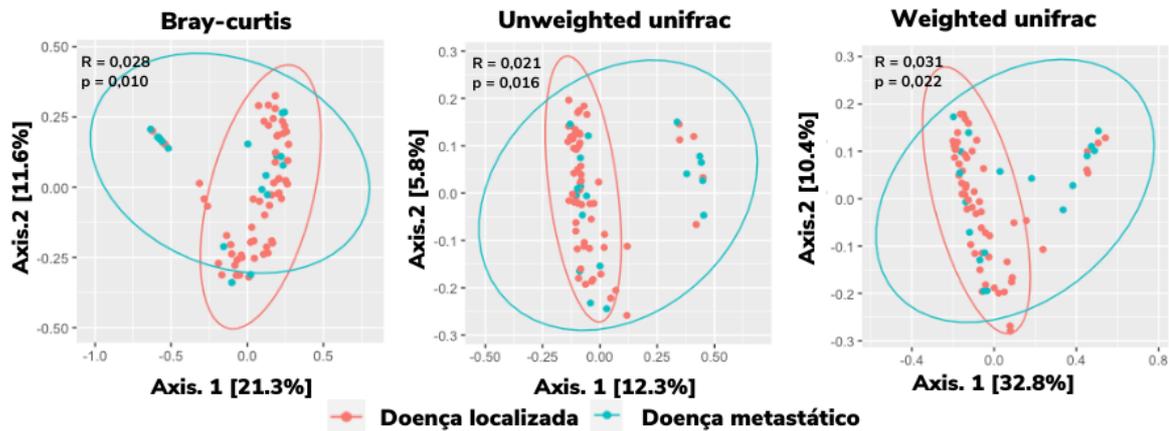


Figura 29 - Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico de indivíduos do grupo AdG, estratificado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico. **Nota.** O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

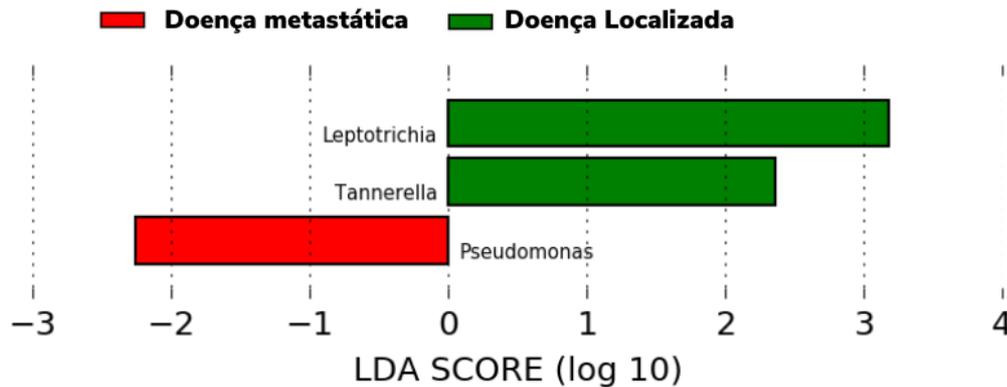


Figura 30 - A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LEfSe) entre os indivíduos com câncer estratificado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico. **Nota.** Um valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos nos testes de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon* aos pares. Para LDA foi considerado um limite de pontuação logarítmica de $\geq 2,0$.

Também estratificamos a análise pela localização tumoral, na diversidade alfa não foi observada diferença estatística entre as localizações Cardia/Fundo (N=19), Corpo (N=32), Antro (N=12) e Transição esofagogástrica (TEG) (N=8) *Observed* (*Anova* $p = 0,913$), *Shannon* *Anova* $p = 0,788$) e *Simpson* (*Kruskal-Wallis* test, $p = 0,564$), resultado similar também foi evidenciado para todas as métricas de diversidade beta *Bray-Curtis* ($p=0,890$), e distâncias *UniFrac Unweighted* ($p=0,768$) e *Weighted* ($p=0,909$). Na análise por *Lefse* não identificamos gêneros diferencialmente abundantes entre as localizações tumorais. Não consideramos nesta análise de localização tumoral 2 indivíduos com tumores do tipo “Linite”, devido ao tamanho amostral limitado e por ter uma característica muito distinta e que impede o agrupamen com outras classificações. Dessa forma, podemos observar que dentre as

variáveis clínicas de nosso estudo, o subtipo histológico de Laurn e o estadiamento da doença parecem ser variáveis importantes que podem estar ligadas a um perfil distinto de gêneros bacterianos dentro os sujeitos com AdG.

4.3 MÓDULO 3: CORRELAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA GÁSTRICA E OS CONTRIBUINTES DIETÉTICOS

Para melhor compreender e integrar os resultados vistos até aqui, produzimos uma matriz de correlação para mapear as associações entre as variáveis dietéticas e a abundância relativa de filos bacterianos (Figura 32). No grupo de AdG identificamos que as fibras totais possuem uma correlação positiva com o filo *Firmicutes* ($r\hat{o} = 0.53$; $p = 0,021$) (Figura 32A). De modo contrário, as fibras totais e os alimentos *in natura* possuem uma correlação forte e negativa com *Proteobacterias* ($r\hat{o} = -0.58$; $p = 0,011$) e ($r\hat{o} = -0.60$; $p = 0,007$), respectivamente. Nesse mesmo contexto, também identificamos uma correlação negativa entre as fibras totais e as *Fusobacteria* ($r\hat{o} = -0.47$; $p = 0.045$), *Chloroflexi* ($r\hat{o} = -0.48$; $p = 0.039$), *Tenericutes* ($r\hat{o} = -0.71$; $p = <0.001$), *Epsilonbacteraeota* ($r\hat{o} = -0.64$; $p = 0.004$). Com destaque para os filos *Tenericutes* e *Epsilonbacteraeota*, que apresentaram respectivamente, um coeficiente de correlação forte e moderado. Vale ressaltar que, na literatura a classificação do coeficiente de correlação de acordo com sua magnitude de força tem sido amplamente utilizada para representar a ligação entre duas variáveis^{197,198,199}. No grupo controle (Figura 32B) os alimentos *in natura* e as fibras insolúveis também apresentaram uma correlação negativa com as *Proteobactérias*, ou seja, quando um aumenta o outro diminui. Estes resultados corroboram outro trabalho realizado com 47 indivíduos sem câncer, que demonstrou que o aumento da ingestão de fibras foi significativamente correlacionado com o aumento da abundância relativa de *Firmicutes* ($r\hat{o} = 0,39$; $p = 0,04$), com uma aparente tendência de uma correlação inversa com a abundância relativa de *Proteobacterias*, porém não significativa ($r\hat{o} = -0.33$; $p = 0.10$) No grupo controle, identificamos uma correlação negativa das fibras totais, solúveis e insolúveis com os filos *Tenericutes*, *Synergistetes* e *Chloroflexi*, efeito esse também encontrado no grupo AdG. Um dado interessante é que para este grupo controle existe uma correlação negativa entre os alimentos ultraprocessados e *Firmicutes* ($r\hat{o} = -0,55$; $p = 0,015$). Liu et al.²⁰⁰ relataram uma diminuição de *Tenericutes* e aumento significativo de *Firmicutes* na microbiota jejunal de porcos 30 dias após dieta rica em fibras provenientes da alfafa. Em humanos, dietas a base de

vegetais estão associadas de forma significativa a níveis fecais aumentados de ácidos graxos de cadeia curta e alguns *Firmicutes* degradadores de fibras ²⁰¹. Dessa forma, podemos observar que aparentemente existe uma sinergia entre as fibras alimentares e os alimentos *in natura*/minimamente processados, que implicam em uma correlação negativa com alguns filios bacterianos nos dois grupos (AdG e controles), ou seja, o aumento de uma dessas variáveis implica na diminuição de sua abundância relativa. Porém, em termos de efeito biológico, é importante ressaltar que a correlação por si só não pode ser atribuída a uma causalidade, porém mostra relação entre marcadores biológicos importantes.

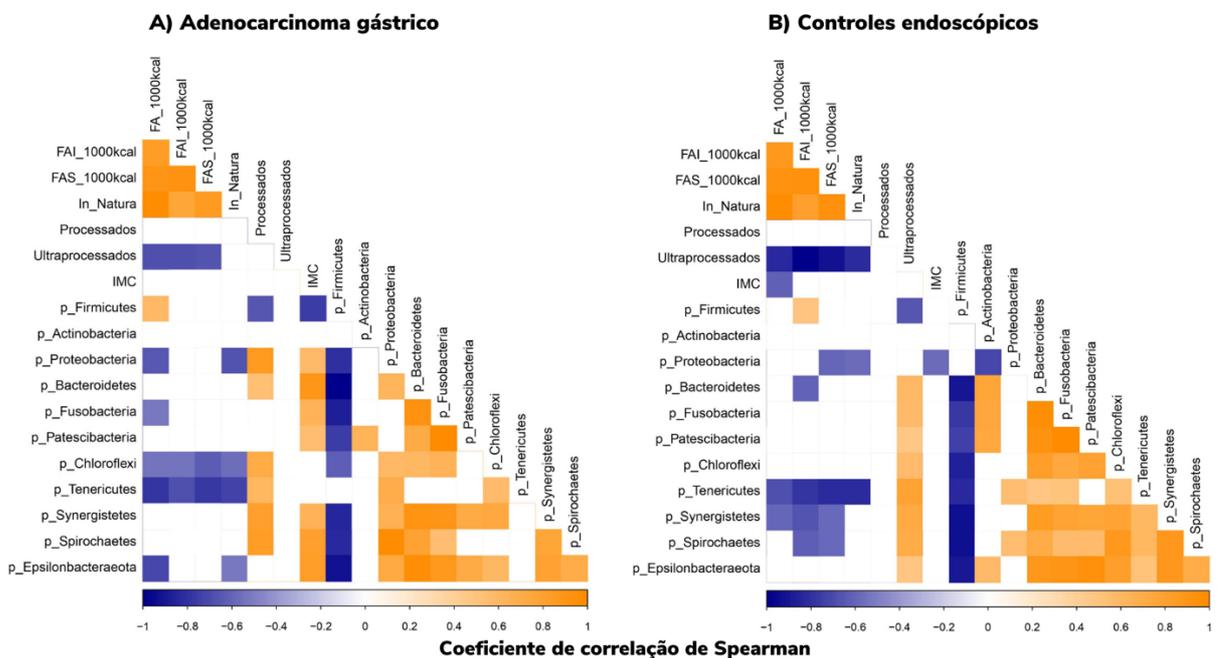


Figura 31 - Matrix de correlação entre variáveis dietéticas e os filios bacterianos nos grupos A) Adenocarcinoma Gástrico e B) Controles endoscópicos. **Nota.** Correlação de Spearman, quadrados em branco quando valor de p não for significativo ($p > 0,05$).

A nível de gênero, entre os 20 mais abundantes entre AdG e controles endoscópico descritos anteriormente, no grupo AdG identificamos uma correlação negativa entre as fibras totais e o gênero *Neisseria* ($r\hat{o} = -0.51$; $p = 0,006$) e também entre fibras insolúveis e o gênero *Megasphaera* ($r\hat{o} = -0.50$; $p = 0,007$). Também foi identificada uma correlação positiva entre o percentual da contribuição calórica de alimentos ultraprocessados na dieta, com as bactérias *Peptostreptococcus* ($r\hat{o} = 0.56$; $p = 0,002$) e *Eubacterium nodatum group* ($r\hat{o} = 0.53$; $p = 0,004$), ambos do filo Firmicutes. Um ponto interessante é que *Peptostreptococcus* é um gênero com perfil associado a inflamação, como será descrito mais adiante. No grupo controle as fibras insolúveis e solúveis apresentaram uma correlação positiva com o gênero

Streptococcus ($r\hat{o} = -0.53$; $p = 0,007$) e ($r\hat{o} = -0.48$; $p = 0,009$), respectivamente. Esses mesmos tipos de fibras alimentares apresentaram uma correlação negativa com *Alloprevotella* ($r\hat{o} = -0.61$; $p = <0,001$) e ($r\hat{o} = -0.50$; $p = 0,007$). Já as fibras insolúveis tiveram uma correlação negativa com *Prevotella* ($r\hat{o} = -0.49$; $p = 0,008$). Outros gêneros que fazem parte dos mais frequentes não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Com base nesses possíveis indícios de uma relação entre a ingestão de fibras e a abundância de algumas bactérias, utilizamos o algoritmo *LEfSe* buscando enfatizar/identificar as diferenças entre dois extremos: a baixa ingestão de fibras (Quartil 1) *versus* alta ingestão (Quartil 4). Identificar essas diferenças permite segregar os gêneros mais associados a essas condições. Na Figura 33, podemos observar essa análise para os grupos AdG e controles endoscópicos. Para o grupo com câncer, no quartil 1 (**Q1**) observamos 4 gêneros diferencialmente abundantes, sendo eles: *Butyrivibrio*, *Helicobacter* e *Stomatobaculum*. Já no quartil 4 (**Q4**) identificamos somente o gênero *F0058*. Para o grupo controle endoscópico no **Q1** foram identificadas 3 bactérias, sendo, *Lautropia*, *Eikenella* e *Kingella*. No **Q4** encontramos um total de 17 gêneros: *Mogibacterium*, *Prevotella* 7, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Eubacterium nodatum group*, *Capnocytophaga*, *Atopobium*, *Parvimonas*, *Prevotella* 6, *Bergeyella*, *Tannerella*, *Oribacterium*, *Johnsonella*, *Stomatobaculum*, *Catonella*.

Nos indivíduos com câncer, *F0058* foi mais frequente no Q4 que é representado por um consumo de fibras maior que 13,44g para cada 1000kcal, grupo este que tem um consumo de fibras total alto, em relação ao Q1(<8,51g/1000 kcal). Embora o LDA tenha sido próximo de 3, infelizmente esse gênero possui uma baixa frequência nas amostras, e dos 23 indivíduos de AdG do quartil 4, somente 2 apresentaram esse gênero. Outro ponto, é que essa bactéria também é pouco descrita na literatura, fato esse que também pode estar relacionado a uma frequência baixa relatada em outros estudos.

O gênero *Butyrivibrio* 2 é amplamente descrito na literatura, devido a sua capacidade de produzir butirato, tanto em animais quanto em humanos^{202,203,204,205}. Porém, é intrigante havermos identificado essa bactéria nos indivíduos com baixo consumo de fibras. Vale ressaltar que o fato de estarmos analisando as fibras totais pode ter influenciado a compreensão desse gênero, visto que o butirato é produzido predominantemente a partir de fibras prebióticas, que possuem características mais solúveis. Dessa forma, uma possível explicação é que algum dos indivíduos com AdG inclusos na análise, mesmo ingerindo menos fibras, podem ter maior predominância em sua ingesta de fibras prebióticas. Já o gênero *Helicobacter*, foi mais frequente nos indivíduos com baixa ingestão de fibras. Neste sentido, o

papel das fibras na infecção por *H. pylori* ainda não é muito conhecido, porém um estudo clínico recente realizou a intervenção por 12 semanas com produtos com adição de farelo de centeio fermentado *versus* produtos de trigo refinado (controle) e não identificou impacto desses produtos ricos em fibras na carga de *H. pylori*²⁰⁶. Essa ausência de diferença pode estar ligada ao fato de algumas cepas já terem sido descritas de forma intracelular^{207,208,209}. Em animais a suplementação de butirato mostrou inibir a viabilidade e virulência, além de reduzir a inflamação associada a microbiota de camundongos infectados por *H. pylori*²¹⁰.

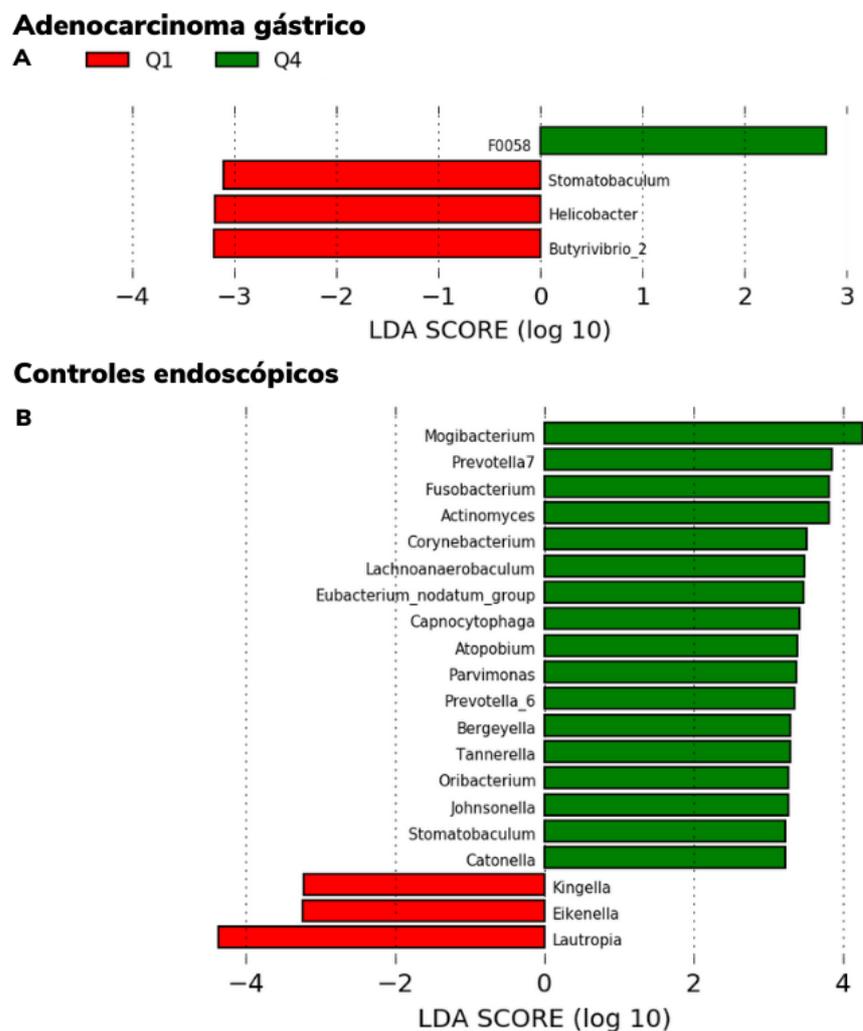


Figura 32 - A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (*LEfSe*) entre casos e controles estratificados pelo consumo de fibras alimentares. **Nota.** A) Análise no grupo AdG; B) Análise no grupo controle. Q1 = Quartil. Q4 = Quartil 4. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos nos testes de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon* aos pares. Para LDA foi considerado um limite de pontuação logarítmica de ≥ 2.0 .

Entre os 17 gêneros diferencialmente abundantes entre controles endoscópicos que tem uma ingestão alta de fibras (Q4), podemos destacar as *Mogibacterium*, *Prevotella 7*,

Fusobacterium e *Actinomyces*. A *Mogibacterium* é um gênero proveniente do filo Firmicutes, descrito inicialmente em 2000²¹¹ com características anaeróbica e gram positiva. Em fezes de animais sua abundância é correlacionada positivamente com as concentrações fecais de butirato, após 42 dias de suplementação de um amido modificado denominado pirodextrinas, que tem características prebióticas²¹². *In vitro* esse gênero também se associa positivamente com a produção de ácido acético e caprótico²¹³. Em humanos a suplementação do amido resistente modificado proveniente da batata também já foi relatada por aumentar a abundância desse gênero, quando comparado com o grupo placebo²¹⁴. Já o gênero *Prevotella* foi associado a um perfil de sujeitos não-ocidentais, sendo que, indivíduos que migraram do sul da Ásia para os Estados Unidos, tiveram uma redução de *Prevotella* e subsequente perda de enzimas degradadoras de fibras, como as hidrolases de glicosídeos, que se originam predominantemente da espécie *Prevotella copri*⁷⁶. Em camundongos a suplementação de xilooligossacarídeo, que é um prebiótico, também levou a um aumento significativo nas porcentagens de *Prevotella* e consequente correlação positiva com o aumento de AGCC, principalmente o butirato²¹⁵. Já a *Fusobacterium*, e principalmente a espécie *Fusobacterium nucleatum*, é considerada uma bactéria patogênica e potencialmente associada ao câncer colorretal^{46,216,217}. Por conta disso, esse gênero é considerado um patógeno intestinal butirogênico, que utiliza vias metabólicas de aminoácidos como o glutamato (4-aminobutirato e glutarato) e lisina para o processo de formação de butirato (butirogênese), que leva a liberação de amônia, um subproduto prejudicial para o hospedeiro^{218,219}. Vale ressaltar que as bactérias comensais utilizam outras vias metabólicas para produção do butirato, como a via do piruvato²²⁰, sugerindo então que no processo evolutivo das bactérias patogênicas elas desenvolverem mecanismos metabólicos diferentes. Porém, mesmo sabendo que ocorre a geração de amônia, ainda não é totalmente claro o impacto dessa produção de butirato vir de uma bactéria comensal ou patogênica. Devido a essa capacidade metabólica, fica mais fácil compreender a presença de *Fusobacterium* em uma dieta mais rica em fibras, porém o seu papel e efeito biológico tem que ser avaliado de acordo com o contexto investigado, além da necessidade de investigar quais são as espécies deste gênero que estão presentes. Vale ressaltar que, esses gêneros mais abundantes em quem ingere menos fibras (Figura 33A) não foram os mesmos observados no mesmo consumo de fibras no grupo controle (Figura 33B), que pode ser explicado pelo fato de já sabermos que o perfil de microbiota entre casos e controles desse projeto ser diferente, sendo que a dieta pode exercer um papel distinto nesses grupos e que o grupo com câncer já tem uma doença instalada, que pode estar associada a uma perturbação de toda composição bacteriana.

Para melhor compreender se as fibras totais têm a capacidade de alterar todo o perfil de microbiota do lavado gástrico, realizamos a análise de diversidade alfa e beta nos grupos AdG e controles sem câncer, estratificando pelos quartis de consumo de fibras. Conforme podemos ver na Figura 34 e Tabela 12, no grupo AdG identificamos uma diversidade alfa maior no **Q2** quando comparado com o **Q4**, tanto para a métrica Observed (107,50 *versus* 68,00) e Shannon (2,58 *versus* 1,94). No entanto, para índice de *Simpson* não encontramos diferença significativa. Para o grupo controle endoscópico identificamos diferenças estatísticas nas 3 métricas avaliadas (Figura 34D-F). Vale ressaltar que as diferenças foram identificadas sempre na comparação dos grupos **Q2** e **Q3** com os demais quartis, mostrando que esses dois quartis citados tem uma diversidade alfa maior. Esses resultados nos fazem supor que no grupo AdG algum outro fator pode estar influenciando a diversidade alfa, visto que não identificamos uma relação estatisticamente significativa entre quem consome mais (**Q4**) e menos fibras (**Q4**). Já no grupo controle, o Q1 parece ser o grupo que visualmente tem uma diversidade alfa menor do que os demais. Mais adiante nesta dissertação iremos analisar o grupo com baixa ingestão de fibras totais (**Q1**), *versus* todos os outros quartis juntos. Vale ressaltar que, para a ingestão de fibras solúveis e insolúveis não identificamos diferença ao longo dos quartis (Apêndice 5 e 6).

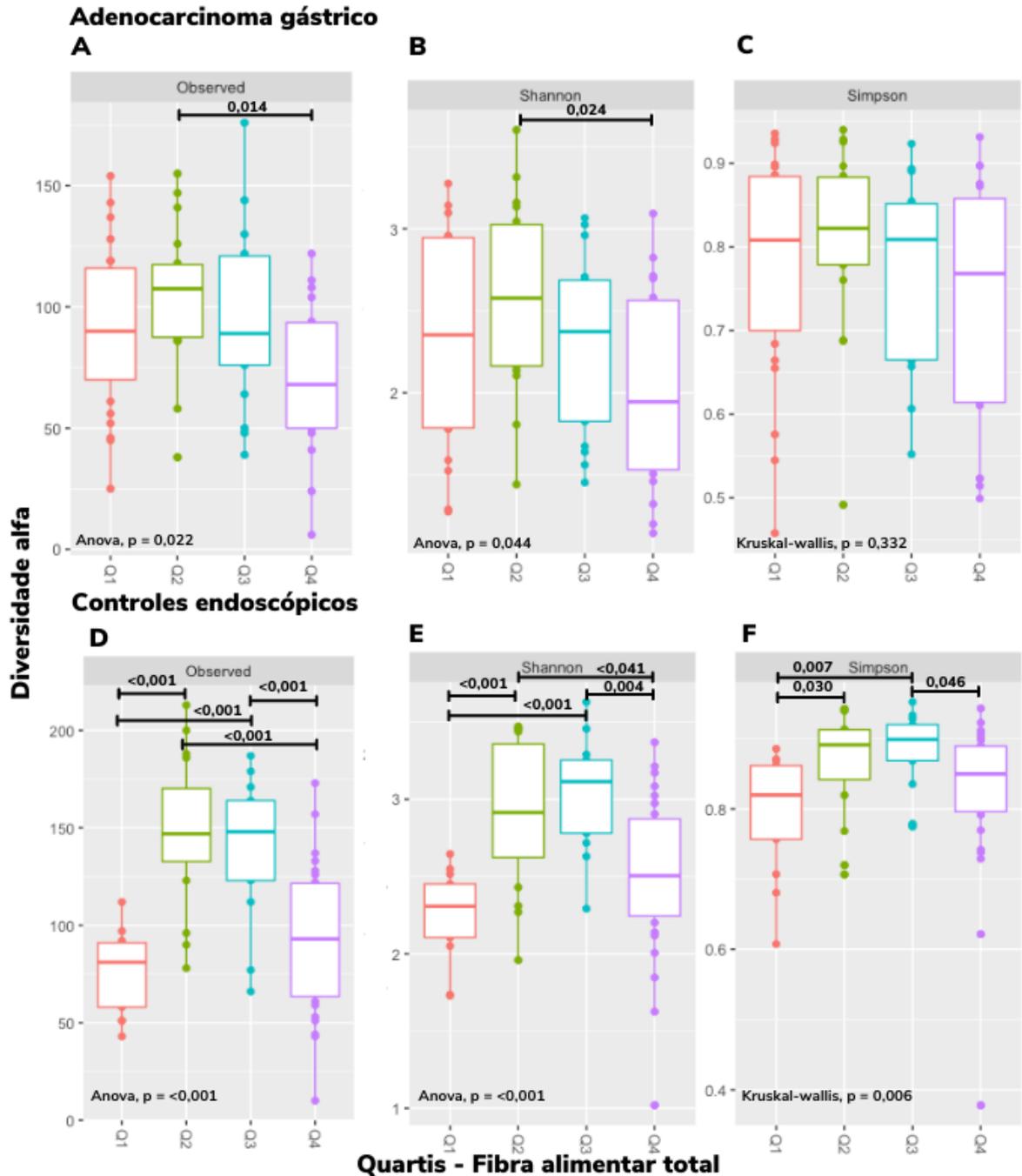


Figura 33 - Comparação múltipla entre as medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico dos grupos AdG e controles endoscópicos, estratificado pelos quartis de consumo de fibra totais. **Nota.** A-C) Comparação entre o grupo AdG. D-F) Comparação entre o grupo controle. Após testar normalidade dos dados, foram utilizados os testes de Anova e Kruskal-Wallis. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Tabela 14 - Avaliação da diversidade alfa entre os grupos AdG e controles sem câncer, estratificado pelos quartis de consumo de fibra alimentar total.

Quartil da ingestão de fibras alimentares totais para cada 1000 kcal														
Métricas	Grupos	Q1 (0 a 8,51g)		Q2 (8,52 a 10,68g)		Q3 (10,69 a 13,43g)		Q4 (≥13,44g)		P valor				
		N	Média (DP)	Mediana (min-max)	N	Média (DP)	Mediana (min-max)	N	Média (DP)		Mediana (min-max)			
Observed	Adenocarcinoma gástrico	24	91,04 (33,19)	90,00 (25,00-154,00)	18	104,22 (29,46)	107,50 (38,00-155,00)	17	95,12 (36,56)	89,00 (39,00-176,00)	18	70,39 (31,73)	68,00 (6,00-122,00)	0,022
	Controles endoscópicos	13	76,23 (20,77)	81,00 (43,00-112,00)	16	148,69 (38,69)	147,00 (78,00-213,00)	13	140,54 (37,13)	148,00 (66,00-187,00)	26	91,96 (38,51)	93,00 (10,00-173,00)	<0,001
Shannon	Adenocarcinoma gástrico	24	2,34 (0,60)	2,35 (1,27-3,27)	18	2,60 (0,57)	2,58 (1,44-3,60)	17	2,31 (0,54)	2,37 (1,45-3,07)	18	2,03 (0,60)	1,94 (1,14-3,09)	0,044
	Controles endoscópicos	13	2,25 (0,28)	2,31 (1,73-2,64)	16	2,90 (0,48)	2,91 (1,96-3,47)	13	3,04 (0,36)	3,11 (2,29-3,63)	26	2,51 (0,52)	2,50 (1,02-3,37)	<0,001
Simpson	Adenocarcinoma gástrico	24	0,78 (0,13)	0,81 (0,46-0,93)	18	0,81 (0,11)	0,82 (0,49-0,94)	17	0,77 (0,11)	0,81 (0,55-0,92)	18	0,72 (0,15)	0,77 (0,50-0,93)	0,332*
	Controles endoscópicos	13	0,79 (0,08)	0,82 (0,61-0,88)	16	0,86 (0,07)	0,89 (0,71-0,94)	13	0,88 (0,06)	0,90 (0,77-0,95)	26	0,82 (0,12)	0,85 (0,38-0,94)	0,006*

Nota. Após testar normalidade dos dados, foram utilizados os testes Anova e *Kruskal-Wallis. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Na diversidade beta, em todas as métricas avaliadas (*Bray-curtis*, *UniFrac weighted* e *unweighted*) (Figura 35), identificamos que as amostras quando separadas pelo quartis de consumo de fibras não são similares, tanto no grupo AdG, como no grupo controle. Realizamos então, um teste em pares dos quartis e identificamos que no grupo AdG não existe diferença entre o **Q1** e o **Q4** *Bray-curtis* ($p = 0.558$), *UniFrac weighted* ($p = 0.646$) e *UniFrac unweighted* ($p = 0.430$). Já no grupo controle, quando comparado esses dois quartis conseguimos identificar que as amostras não são similares, visto que possuem um valor de $P < 0,05$ *Bray-curtis*, ($p = 0.043$), *UniFrac weighted* ($p = 0.031$) e *UniFrac unweighted* ($p = 0.031$). Quando estratificado os indivíduos dos grupos AdG e controles endoscópicos pelos quartis de ingestão de fibras solúveis e insolúveis, de acordo com a diversidade beta, identificamos que tanto os sujeitos do grupo AdG como controles endoscópicos são similares de acordo com a estratificação por quartis (Apêndices 7 e 8). Um ponto interessante é que conforme podemos ver na Figura 35B, os indivíduos controles com uma menor ingestão de fibras totais (**Q1**) parecem se separar dos demais quartis, dessa forma, para melhor compreender essa característica, realizamos uma análise separada para avaliar o quanto esse grupo se difere dos demais, tanto na diversidade alfa como na beta. Na figura 36 podemos identificar que a microbiota gástrica dos sujeitos com uma baixa ingestão de fibras totais (**Q1 = <8,51g/1000 kcal**) é caracterizada por uma diversidade alfa menor, ou seja, um número de bactérias e uma abundância relativa menor quando comparado com os demais indivíduos que ingerem mais fibras totais. Na diversidade beta (Figura 37B) também identificamos que esse grupo é distinto dos demais, quando considerada a distância na classificação filogenética e a quantidade de *reads*/abundância bacteriana.

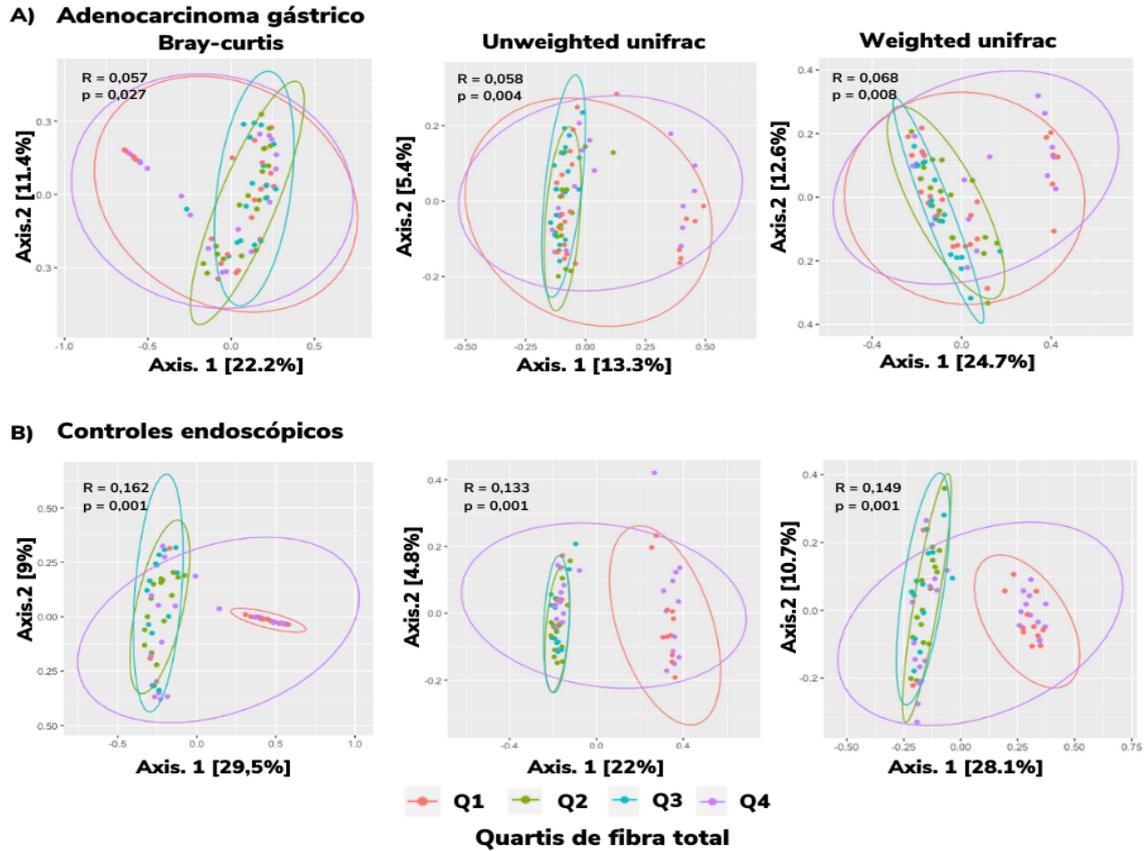


Figura 34 - Avaliação da diversidade beta nas amostras de fluido gástrico entre os quartis de ingestão de fibra alimentar total nos grupos de casos com Adenocarcinoma gástrico e controles endoscópicos. **Nota.** A) Comparação entre o grupo AdG. B) Comparação entre o grupo controle sem câncer. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

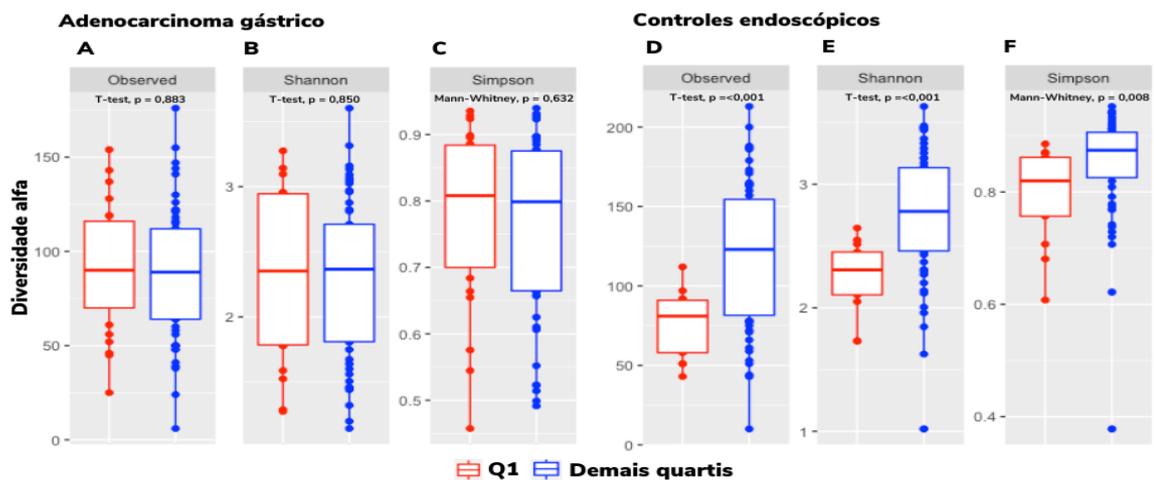


Figura 35 - Comparação entre as medidas de diversidade alfa nas amostras de fluido gástrico dos grupos AdG e controles endoscópicos, estratificada pela mais baixa ingestão de fibras (Q1) versus os demais quartis. **Nota.** A-C) Comparação entre o grupo AdG. D-F) Comparação entre o grupo controle. Após testar normalidade dos dados, foram utilizados os testes de T-test e Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

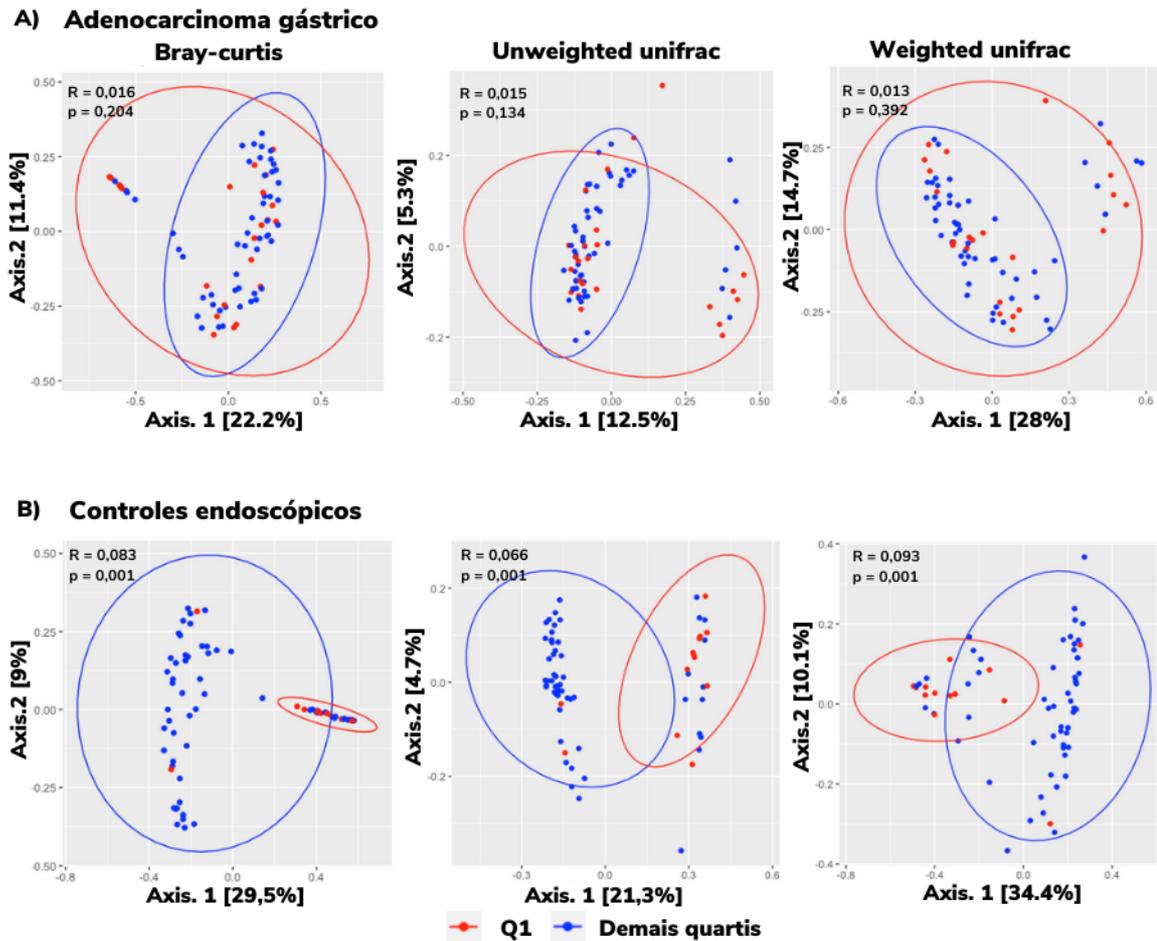


Figura 36 - Comparação entre as medidas de diversidade beta nas amostras de fluido gástrico dos grupos AdG e controles endoscópicos, estratificado pela mais baixa ingestão de fibras (Q1) *versus* os demais quartis. **Nota.** A) Comparação entre o grupo AdG. B) Comparação entre o grupo controle endoscópico. O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Com base nos resultados descritos até aqui realizamos a análise de Lefse comparando os extremos de consumo de fibras alimentares de casos AdG (N=77), *versus* controles endoscópicos normal/gastrite superficial (N=50). Na figura 38, quando comparado Q1 do grupo AdG (N= 24) *versus* Q4 do grupo controle (N= 26), o gênero *Abiotrophia* foi mais abundante no Q4, enquanto os gêneros *Escherichia_Shigella*, *Roseburia*, *Candidatus_Saccharimonas* e *Fretibacterium* foram mais frequentes no Q1 do grupo AdG, ou seja, nos indivíduos com câncer que consomem menos fibras.

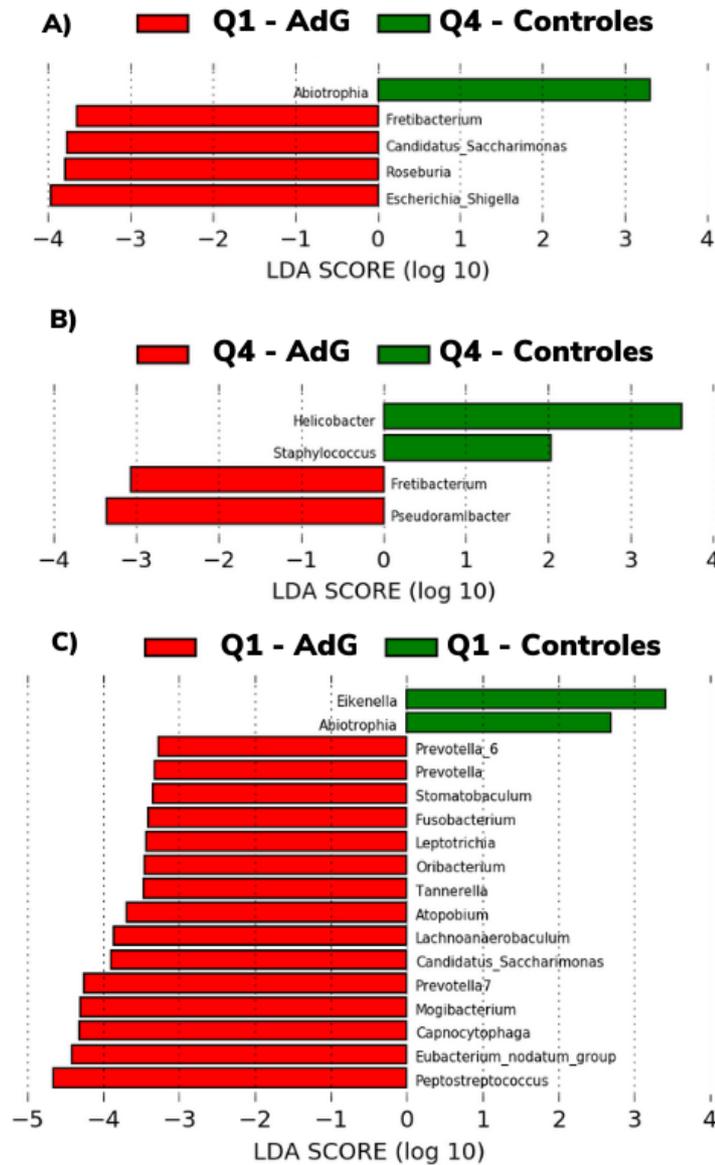


Figura 37 - A análise discriminante linear (LDA) combinada com medidas de tamanho de efeito (LEfSe) comparando casos *versus* controles com exame de endoscopia norma/gastrite superficial, quando estratificados pela baixa (Q1) e alta (Q4) ingestão de fibras. **Nota.** Q1 = Quartil. Q4 = Quartil 4. Um valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos nos testes de *Kruskal-Wallis* e *Wilcoxon* aos pares. Para LDA foi considerado um limite de pontuação logarítmica de ≥ 2.0 .

O gênero *Peptostreptococcus* pertencente a família *Peptostreptococcaceae* e ao filo *Firmicutes*, foi o que mais se destacou e apresentou maior abundância nos indivíduos do grupo AdG que ingerem menos fibras, quando comparado do *Lefse* com quem teve a mesma ingestão de fibras no grupo AdG (Figura 38C). Um ponto interessante foi a observação que o gênero *Peptostreptococcus*, já citado anteriormente (Figura 30/ página 76) por apresentar uma correlação positiva entre o percentual da contribuição calórica de alimentos ultraprocessados na dieta ($rô = 0.56$; $p = 0,002$), foi o mais abundante no grupo com baixa ingestão de fibras (Q1), exatamente por estes indivíduos terem um consumo maior de alimentos

industrializados, que são na grande maioria pobres em fibras (**Q1**). Por exemplo, a espécie *Peptostreptococcus anaerobius* pertencente a esse gênero, foi identificado por Long et al.²¹³ como uma bactéria que inicia e promove a cascata oncogênica *PI3K-Akt-FAK*, promovendo a proliferação de células tumorais, enquanto concomitantemente modula aspectos imunológicos do tumor para promover a tumorigênese em indivíduos com câncer colorretal. Outro trabalho também identificou um enriquecimento de *Peptostreptococcus* em indivíduos (N=46) com esse mesmo tipo de tumor, enquanto que 5 OTUs pertencentes ao gênero *Roseburia* e outras bactérias produtoras de butirato da família *Lachnospiraceae* foram menos abundantes quando comparadas com indivíduos saudáveis (N=56)²²¹. Embora não tenhamos encontrado uma evidência na literatura que associe diretamente a baixa ingestão de fibras com uma maior abundância dos gêneros *Peptostreptococcus*, o gênero *Filifactor*, por exemplo, já foi descrito como sendo um dos grandes influenciados entre a composição da microbiota oral e a dieta²²⁷. Nesse contexto, An Li et al.²²² publicaram um trabalho transversal publicado ainda em 2021, com 7081 sujeitos provenientes do programa americano *National Health and Nutrition Examination Survey* e identificaram que quem consumiu uma dieta pró-inflamatória teve 53% mais probabilidade de ter periodontite (OR tercil 3 versus 1 = 1,53, IC 95%: 1,33-1,77). Essa dieta ocidental, tem um potencial pró-inflamatório importante por ser diminuída em fibras, rica em carnes vermelha, carnes processadas, gordura saturada e carboidratos simples. Dessa forma nossa hipótese é que a composição da dieta de baixa densidade nutricional, pode influenciar de alguma forma na abundância de gêneros com característica pró-inflamatória em indivíduos do grupo AdG que tiveram baixa ingestão de fibras (**Q1**), e que essa modulação pode se iniciar na boca, e por isso essas bactérias foram também identificadas no lavado gástrico desses pacientes.

5 CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÕES MÓDULO 1

- A dieta se difere entre os grupos estudados, tanto pela contribuição acerca de alimentos *in natura*/minimamente processados, quanto dos ultraprocessados. Sendo que esta variação influencia diretamente a quantidade de fibras alimentares ingeridas.
- Observamos que a maior ingestão de fibras insolúveis e menor de alimentos ultraprocessados está associada a um fator protetor para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, quando comparado a indivíduos do grupo controle saudável (provenientes da campanha do A.C.Camargo Cancer Center).
- Nos controles endoscópicos não houve uma associação entre o consumo de fibras quando considerada na regressão logística diversos fatores como: idade, sexo, etnia, escolaridade, uso de inibidores de bomba de prótons e tabagismo. Sugerindo assim que indivíduos deste grupo que possuem alguma alteração epitelial gástrica provavelmente já possuem algumas características clínicas e de estilo de vida que os aproximam do grupo AdG.

5.2 CONCLUSÕES MÓDULO 2

Em termos de microbiota bacteriana gástrica identificamos diferenças promissoras entre casos e controles endoscópicos, que podem ser compiladas em:

- O filo *Firmicutes* foi mais abundante no lavado gástrico de sujeitos com AdG. Já os filos *Bacteroidetes*, *Proteobacterias*, *Spirochaetes* foram mais abundantes nos controles sem câncer, sendo que os dois últimos gêneros foram mais abundantes nos sujeitos com ausência de inflamação epitelial, ou com um grau mais leve, que é a gastrite superficial.
- Identificamos no grupo AdG a presença de alguns gêneros descritos na literatura como abundantes no microbioma oral, como as *Actinobacillus*, *Bergeyela*,

Lachnoanaerobaculum e *Atopobium*. Estes gêneros geralmente tem um perfil mais pró-inflamatório.

- No grupo controle endoscópico com exame normal/gastrite superficial, o gênero *Prevotella 7* foi mais abundante quando comparado com o grupo AdG e pode ter um efeito biológico associado à saúde.
- No grupo controle endoscópico observamos uma diversidade alfa maior, ou seja, uma maior riqueza de bactérias e maior abundância total desses microrganismos. A nível de diversidade beta vimos que os dois grupos são distintos, tanto em termos de quantidade de bactérias, quanto na distância taxonômica. Porém ainda não está claro se é o processo de carcinogênese que está influenciando a mudança deste perfil, ou se é a microbiota que influencia a formação tumoral, ou ainda se tem um efeito protetor nos controles endoscópicos.

5.3 CONCLUSÕES MÓDULO 3

Na integração e comparação entre os dados de rRNA 16S e as variáveis dietéticas, podemos concluir que:

- Para o filo *Firmicutes*, o grupo AdG teve uma correlação positiva com as fibras totais no grupo AdG. Já nos controles endoscópicos, um efeito similar foi observado com as fibras insolúveis. Essas possíveis relações podem ser explicadas pelo fato de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta serem muito comuns neste filo;
- Identificamos uma possível sinergia entre as fibras alimentares e os alimentos *in natura*/minimamente processados, que implica em uma correlação negativa com alguns filos bacterianos nos dois grupos avaliados: como os *Tenericutes*, *Synergistetes* e *Chloroflexi*. Essa relação ainda não é clara nem foi descrita na literatura, porém vale registrar que gêneros provenientes destes filos são de uma forma geral menos abundantes no estomago.
- Entre os controles endoscópicos destacamos os gêneros *Mogibacterium*, *Prevotella 7* e *Fusobacterium* identificados como mais abundantes nos sujeitos com alto consumo de fibras totais. Esse achado talvez esteja associado à maior capacidade destes gêneros produzirem ácidos graxos de cadeia curta.
- No grupo AdG com baixa ingestão de fibras totais identificamos uma maior abundância de gêneros descritos na literatura, como *Peptostreptococcus*, *Helicobacter*

e *Escherichia_shigella*, frequentemente associados na literatura com infecções e alguns tipos de câncer do trato gastrointestinal.

- O conteúdo de fibras totais, solúveis e insolúveis não explica toda a diversidade alfa e beta dos lavados gástricos dos pacientes do grupo AdG. Efeito contrário foi observado no grupo controle endoscópico, onde os indivíduos com menor ingestão de fibras possuem uma diversidade alfa e beta menor, quando comparados com os demais quartis de consumo de fibras desse grupo. Esses resultados bem distintos entre casos e controles, podem estar associados ao fato dos indivíduos do grupo AdG já terem uma doença instalada, com consequente disbiose, que dificulta a identificação do impacto das fibras na diversidade total das bactérias estomacais.

5.4 CONCLUSÕES FINAIS

- De uma forma geral em nosso trabalho podemos observar que a dieta é um fator importante, que pode influenciar no aparecimento e desenvolvimento do câncer, e que as fibras alimentares, e provavelmente toda a sinergia da matriz alimentar, podem influenciar na composição do perfil de microbiota estomacal desses indivíduos, antes mesmo do desenvolvimento da doença;
- Destacamos nos controles endoscópicos com alto consumo de fibras, uma maior abundância de gêneros produtores de ácidos graxos de cadeia curta e importante atividade imunomodulatória. Já no grupo AdG com baixa ingestão de fibras, identificamos gêneros com um perfil pró-inflamatório, como o *Helicobacter*. Nesse sentido, fica ainda uma lacuna a ser aprofundada no futuro, relacionada a quanto esse perfil de bactérias estomacais de indivíduos que consomem mais fibras podem refletir/impactar na microbiota intestinal, local onde ocorre a maior fermentação de fibras no organismo humano.
- Embora tenhamos identificado no lavado gástrico uma série de gêneros bacterianos nas várias análises feitas, ainda não está claro se estes gêneros são residentes, ou transientes do estômago. Neste sentido, serão necessárias avaliações do bacterioma das biópsias gástricas tumorais e não tumorais, e comparação com os dados gerados dos lavados gástricos apresentados na presente dissertação.

6 REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer J Clin*. 2018;68:394–424.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020-Incidência de câncer no Brasil. 2019. Disponível em: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>. [2021 abr 17]
3. Chiurillo MA. Role of gene polymorphisms in gastric cancer and its precursor lesions: Current knowledge and perspectives in Latin American countries. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4503.
4. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res*. 2018;10:239–48.
5. Cutsem E Van, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Seminar gastric cancer. *Lancet*. 2016;388:2654–64.
6. Fang X, Wei J, He X, An P, Wang H, Jiang L, et al. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*. 2015 Dec;51(18):2820–32.
7. Hyndman IJ. Review: the contribution of both nature and nurture to carcinogenesis and progression in solid tumours. *Cancer Microenviron*. 2016;9(1):63–9.
8. Takahashi T, Saikawa Y, Kitagawa Y. Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment. *Cancers (Basel)*. 2013;5(1):48–63.
9. Marano L, Polom K, Patrìti A, Roviello G, Falco G, Stracqualursi A, et al. Surgical management of advanced gastric cancer: an evolving issue. *Eur J Surg Oncol*. 2016;42(1):18–27.
10. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49.
11. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2017 Jun 1;3(1):17036.
12. Li X, Zhu X, Wang Y, Wang R, Wang L, Zhu ML, et al. Prognostic value and association of lauren classification with vegf and vegfr-2 expression in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(5):4891–9.
13. Berlth F, Bollschweiler E, Drebber U, Hoelscher AH, Moenig S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5679.
14. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–9.
15. Weledji PE. The principles of the surgical management of gastric cancer. *Int J Surg Oncol*. 2017;2(7):11.
16. Toneto MG, Viola L. Current status of the multidisciplinary treatment of gastric adenocarcinoma. *Arq Bras Cir Dig*. 2018 Jul 2;31(2):e1373.
17. Davies AR, Maisey N, Smyth EC, Allum WH, Cunningham D, Gossage JA, et al. Tumor stage after neoadjuvant chemotherapy determines survival after surgery for adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *J Clin Oncol*.

- 2014;32(27):2983–90.
18. Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2019;393(10184):1948–57.
 19. Mueller JL, Kim DH, Stapleton S, Cauley CE, Chang DC, Park CH, et al. Nature versus nurture: the impact of nativity and site of treatment on survival for gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2019;22(3):446–55.
 20. Suzuki H, Matsuzaki J. Gastric cancer: evidence boosts helicobacter pylori eradication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Aug 30;15(8):458–60.
 21. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2018 Feb;67(2):226–36.
 22. Choi IJ, Kook M-C, Kim Y-I, Cho S-J, Lee JY, Kim CG, et al. Helicobacter pylori therapy for the prevention of metachronous gastric cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(12):1085–95.
 23. International Agency for Research on Cancer-IARC. Humans T. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans. 1994;71:1–241.
 24. Brawner KM, Morrow CD, Smith PD. Gastric microbiome and gastric cancer. *Cancer J*. 2014;20(3):211–6.
 25. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur Gastroenterol J*. 2015 Jun 14;3(3):255–60.
 26. Zaccari BG, Rocco P, Scalese G S, Panetta G, Porowska C P, Pontone B, et al. Proton pump inhibitors and dysbiosis: Current knowledge and aspects to be clarified. *World J Gastroenterol*. 2019;25(22):2706–19.
 27. Schulz C, Schütte K, Mayerle J, Malfertheiner P. The role of the gastric bacterial microbiome in gastric cancer: helicobacter pylori and beyond. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1–11.
 28. Saha A, Hammond CE, Beeson C, Peek RM, Smolka AJ. Helicobacter pylori represses proton pump expression and inhibits acid secretion in human gastric mucosa. *Gut*. 2010;59(7):874–81.
 29. Waldum HL, Kleveland PM, Sørdal ØF. Helicobacter pylori and gastric acid: An intimate and reciprocal relationship. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016;9(6):836–44.
 30. Malfertheiner P, Kandulski A, Venerito M. Proton-pump inhibitors: understanding the complications and risks. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(12):697–710.
 31. Imhann F, Bonder MJ, Vila AV, Fu J, Mujagic Z, Vork L, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*. 2016;65(5):740–8.
 32. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1).
 33. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(6):383–90.
 34. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):35–56.
 35. Mimica MJ. Microbioma humano: conceito, principais características, e potenciais implicações patológicas e terapêuticas. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med St Casa*. 2017;62(1):42–5.

36. Maltez TA, Prata LF, Moura LMS, Silva AM, Dias-Neto E, Setubal JC. Comparative metagenomics. In: *Methods in molecular biology*. 2018. p.243–60. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7463-4_8
37. Rico K, Canizales-Quinteros S, Ochoa-Leyva A, Soberón X, Del Pozo-Yauner L, Valdez-Lara A, et al. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015;13:390–401.
38. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O Keefe S, Mitchel T, et al. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Front Microbiol*. 2016;7(APR):459.
39. Zhang X, Li L, Butcher J, Stintzi A, Figeys D. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome*. 2019;7(1):1–12.
40. Ellermann M, Carr JS, Fodor AA, Arthur JC, Carroll IM. Characterizing and functionally defining the gut microbiota: methodology and implications. In: Floch MH, Ringel Y, Walker WA, editors. *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology: implications for human health, prebiotics, probiotics dysbiosis*. New York: Elsevier; 2016. p.15–25.
41. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):833–44.
42. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):143–55.
43. Pichon M, Burucoa C. Impact of the gastro-intestinal bacterial microbiome on helicobacter-associated diseases. *Healthc (Basel, Switzerland)*. 2019 Feb 22;7(1):34.
44. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016 Dec 27;8(1):51.
45. Thomas AM, Jesus EC, Lopes A, Aguiar S, Begnami MD, Rocha RM, et al. Tissue-associated bacterial alterations in rectal carcinoma patients revealed by 16S rRNA community profiling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6(December):179.
46. Thomas AM, Manghi P, Asnicar F, Pasolli E, Armanini F, Zolfo M, et al. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nat Med*. 2019 Apr 1;25(4):667–78.
47. McQuade JL, Daniel CR, Helmink BA, Wargo JA. Modulating the microbiome to improve therapeutic response in cancer. *Lancet Oncol*. 2019 Feb;20(2):e77–91.
48. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr;17(4):219–32.
49. Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome - a potential controller of wellness and disease. *Front Microbiol*. 2018;9(AUG):1–23.
50. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000 Aug 1;165(3):1259–65.
51. Gong J, Li L, Zuo X, Li Y. Change of the duodenal mucosa-associated microbiota is related to intestinal metaplasia. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):1–7.
52. Hou TY, Davidson LA, Kim E, Fan Y-Y, Fuentes NR, Triff K, et al. Nutrient-gene interaction in colon cancer, from the membrane to cellular physiology. *Annu Rev Nutr*. 2016;36(1):543–70.
53. Theodoratou E, Timofeeva M, Li X, Meng X, Ioannidis JPA. Nature, nurture, and cancer risks: genetic and nutritional contributions to cancer. *Annu Rev Nutr*. 2017;37(1):293–320.
54. Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, Castro IRR de, Cannon G. A new classification of

- foods based on the extent and purpose of their processing. *Cad Saude Publica*. 2010;26(11):2039–49.
55. Monteiro CA, Cannon G, Lawrence M, Costa Louzada ML, Pereira Machado P. Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system. Rome: FAO; 2019. 48p.
 56. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. p.156.
 57. Monteiro CA, Cannon G, Moubarac J-C, Levy RB, Louzada MLC, Jaime PC. The UN decade of nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutr*. 2018 Jan;21(1):5–17.
 58. Rauber F, Louzada ML da C, Steele EM, Millett C, Monteiro CA, Levy RB. Ultra-processed food consumption and chronic non-communicable diseases-related dietary nutrient profile in the UK (2008–2014). *Nutrients*. 2018;10(5).
 59. Trudeau K, Rousseau MC, Parent MÉ. Extent of food processing and risk of prostate cancer: The proteus study in montreal, Canada. *Nutrients*. 2020;12(3):1–12.
 60. Srour B, Fezeu LK, Kesse-Guyot E, Allès B, Debras C, Druesne-Pecollo N, et al. Ultraprocessed food consumption and risk of type 2 diabetes among participants of the nutrinet-santé prospective cohort. *JAMA Intern Med*. 2020;180(2):283–91.
 61. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med*. 2018;24(4):392–400.
 62. Blaser MJ. The theory of disappearing microbiota and the epidemics of chronic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jul 27;17(8):461–3.
 63. Roca-Saavedra P, Mendez-Vilabril V, Miranda JM, Nebot C, Cardelle-Cobas A, Franco CM, et al. Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota-a review. *J Physiol Biochem*. 2018 Feb;74(1):69–83.
 64. Medina-Reyes EI, Rodríguez-Ibarra C, Déciga-Alcaraz A, Díaz-Urbina D, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Food additives containing nanoparticles induce gastrotoxicity, hepatotoxicity and alterations in animal behavior: the unknown role of oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2020 Dec;146:111814.
 65. Chazelas E, Deschasaux M, Srour B, Kesse-Guyot E, Julia C, Alles B, et al. Food additives: distribution and co-occurrence in 126,000 food products of the French market. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–15.
 66. Smith C, Van Haute MJ, Rose DJ. Processing has differential effects on microbiota-accessible carbohydrates in whole grains during in vitro fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(21):1–16.
 67. Martínez I, Stegen JC, Maldonado-Gómez MX, Eren MA, Siba PM, Greenhill AR, et al. The gut microbiota of rural papua new guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep*. 2015;11(4):527–38.
 68. Das B, Ghosh TS, Kedia S, Rampal R, Saxena S, Bag S, et al. Analysis of the gut microbiome of rural and urban healthy indians living in sea level and high altitude areas. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–15.
 69. Oduaran OH, Tamburini FB, Sahibdeen V, Brewster R, Gómez-Olivé FX, Kahn K, et al. Gut microbiome profiling of a rural and urban South African cohort reveals biomarkers of a population in lifestyle transition. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):1–17.
 70. Kabwe MH, Vikram S, Mulaudzi K, Jansson JK, Makhalanyane TP. The gut mycobiota of rural and urban individuals is shaped by geography. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):1–12.
 71. Cattafesta M, Petarli GB, Zandonade E, de Paula Alves Bezerra OM, Ribeiro de Abreu SM, Salaroli LB. Energy contribution of NOVA food groups and the nutritional profile

- of the Brazilian rural workers diets. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240756.
72. Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, Arike L, Johansson ME V, Hansson GC, et al. Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):27-40.e7.
 73. Johansson ME V, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):639–49.
 74. Neuhouser ML. The importance of healthy dietary patterns in chronic disease prevention. *Nutr Res*. 2019;70:3-6.
 75. Reimer RA. Establishing the role of diet in the microbiota-disease axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Feb;16(2):86–7.
 76. Vangay P, Johnson AJ, Ward TL, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Hillmann BM, et al. US immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell*. 2018 Nov;175(4):962-972.e10.
 77. GBD 2017 Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet*. 2019 Apr 3;6736(19).
 78. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell*. 2018 Jun 11;33(6):954–64.
 79. O Keefe SJD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Dec 16;13(12):691–706.
 80. Bishehsari F, Engen PA, Preite NZ, Tuncil YE, Naqib A, Shaikh M, et al. Dietary fiber treatment corrects the composition of gut microbiota, promotes scfa production, and suppresses colon carcinogenesis. *Genes (Basel)*. 2018 Feb 16; 9(2):102.
 81. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M, Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine TNA. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc*. 2002 Nov;102(11):1621–30.
 82. Instituto Brasileiro de Geografia-IBGE. POF: 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Vol. 46, Rio de Janeiro. 2020. p.983–7. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/educacao/24786-pesquisa-de-orcamentos-familiares-2.html?edicao=28523&t=publicacoes>
 83. Williams BA, Grant LJ, Gidley MJ, Mikkelsen D. Gut fermentation of dietary fibres: physico-chemistry of plant cell walls and implications for health. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 20;18(10):2203.
 84. Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013 Apr 22;5(4):1417–35.
 85. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2017;8(2):172–84.
 86. Thompson SV, Hannon BA, An R, Holscher HD. Effects of isolated soluble fiber supplementation on body weight, glycemia, and insulinemia in adults with overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(6):1514–28.
 87. Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes Environ Environ*. 2017;32(4):300–13.
 88. Meijer K, de Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Nov;13(6):715–21.
 89. Li M, van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2018 Jul 15;831(April):52–9.

90. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab.* 2014;20(5):779–86.
91. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature.* 2016;535(7610):56–64.
92. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature.* 2016;529(7585):212–5.
93. Spencer C, McQuade J, Gopalakrishnan V, Andrews MC, Helmink B. The gut microbiome of melanoma patients is distinct from healthy controls, and associations with treatment outcomes are influenced by host lifestyle factors. In: *Proceedings of the 110th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2019 March 29 - April 3; Atlanta, GA. Philadelphia (PA): AACR; 2019.
94. Nobel YR, Snider EJ, Compres G, Freedberg DE, Khiabani H, Lightdale CJ, et al. Increasing dietary fiber intake is associated with a distinct esophageal microbiome. *Clin Transl Gastroenterol.* 2018 Oct 25;9(10):199.
95. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell.* 2016;167(5):1339-1353.e21.
96. Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr.* 2013 May 1;4(3):384S-92S.
97. Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong ANT. Cancer chemoprevention by phytochemicals: Potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(9):1409–21.
98. Koh YC, Ho CT, Pan MH. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. *J Food Drug Anal.* 2020;28(1):14–37.
99. Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG, Ayala-Zavala JF, Bello-Perez LA, Álvarez-Parrilla E, et al. Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: Interaction and possible effect after ingestion. *Food Funct.* 2014;5(6):1063–72.
100. Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Prior A, Vioque B, Fernández-Bolaños J. Strawberry dietary fiber functionalized with phenolic antioxidants from olives. Interactions between polysaccharides and phenolic compounds. *Food Chem.* 2019 May 15;280:310–20.
101. Dobson CC, Mottawea W, Rodrigue A, Buzati Pereira BL, Hammami R, Power KA, et al. Impact of molecular interactions with phenolic compounds on food polysaccharides functionality. *Adv Food Nutr Res.* 2019;90:135–81.
102. Williamson G, Clifford MN. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2017;139:24–39.
103. Zubair H, Khan MA, Anand S, Srivastava SK, Singh S, Singh AP. Modulation of the tumor microenvironment by natural agents: implications for cancer prevention and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2020 May 26;(May):1–18.
104. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin LH. *International classification of diseases for oncology.* 3rd ed. Washington: World Health Organization; 2000. p.240.
105. Christoff AP, Sereia AFR, Boberg DR, Moraes RLV OL. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosperta Microbiome Technol.* 2017;1–5.
106. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852–7.

107. Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, et al. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *mSystems*. 2017 Mar 7;2(2):e00191-16.
108. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):590–6.
109. Lameza MMS. Validação de questionário de frequência alimentar para pacientes tratados de câncer colorretal monica macedo dos santos lameza. [São Paulo]; 2010.
110. Ferrari A, de Carvalho AM, Steluti J, Teixeira J, Marchioni DML, Aguiar S. Folate and nutrients involved in the 1-carbon cycle in the pretreatment of patients for colorectal cancer. *Nutrients*. 2015;7(6):4318–35.
111. Ferrari A, Tardin Torrezan G, Maria Carraro D, Aguiar Junior S. Association of folate and vitamins involved in the 1-carbon cycle with polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and global DNA methylation in patients with colorectal cancer. *Nutrients*. 2019;11(6):1–14.
112. Instituto Brasileiro de Geografia-IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Tabela de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. *Produção Pecuária Municipal*. 2011;39:35–340.
113. NEPA – UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos. 4ª ed. Campinas; 2011. 161p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>
114. Philippi TS. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 6ª ed. São Paulo: Manole. 2017. 160p.
115. Nielsen SJ, Adair L. An alternative to dietary data exclusions. *J Am Diet Assoc*. 2007;107(5):792–9.
116. Rauber F, Louzada MLDC, Martinez Steele E, De Rezende LFM, Millett C, Monteiro CA, et al. Ultra-processed foods and excessive free sugar intake in the UK: A nationally representative cross-sectional study. *BMJ Open*. 2019;9(10):1–11.
117. World Health Organization-WHO. Global Health Observatory Overweight and Obesity.. Database: figshare. 2000. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/. [2020 dez 22]
118. Pan American Health Organization-PAHO. Multicentric health beinestar and aging survey (SABE) in Latin America the Caribbean: preliminary report. Washington, D.C; 2001.
119. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun 24;12(6):R60.
120. Romeiro ACT, Curioni CC, Bezerra FF, Faerstein E. Sociodemographic determinants of food consumption pattern: Pró-Saúde Study. *Rev Bras Epidemiol*. 2020;23:e200090.
121. Pinto de Souza Fernandes D, Duarte MSL, Pessoa MC, Franceschini S do CC, Ribeiro AQ. Evaluation of diet quality of the elderly and associated factors. *Arch Gerontol Geriatr*. 2017 Sep;72:174–80.
122. Shan Z, Rehm CD, Rogers G, Ruan M, Wang DD, Hu FB, et al. Trends in dietary carbohydrate, protein, and fat intake and diet quality among US adults, 1999-2016. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2019;322(12):1178–87.
123. Galvão-Podestá O, Curado M, Peres S, Salaroli L, Cattafesta M, Podestá JRV De, et al. Consumption of minimally processed foods as protective factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil (P05-032-19). *Curr Dev Nutr*. 2019;3(Supplement_1):1–19.
124. Weaver CM, Dwyer J, Fulgoni VL, King JC, Leveille GA, MacDonald RS, et al. Processed foods: contributions to nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(6):1525–42.

125. Drewnowski A, Dwyer J, King JC, Weaver CM. A proposed nutrient density score that includes food groups and nutrients to better align with dietary guidance. *Nutr Rev.* 2019;77(6):404–16.
126. Martínez Steele E, Popkin BM, Swinburn B, Monteiro CA. The share of ultra-processed foods and the overall nutritional quality of diets in the US: Evidence from a nationally representative cross-sectional study. *Popul Health Metr.* 2017;15(1):1–11.
127. MacHado PP, Steele EM, Levy RB, Sui Z, Rangan A, Woods J, et al. Ultra-processed foods and recommended intake levels of nutrients linked to non-communicable diseases in Australia: Evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ Open.* 2019;9(8).
128. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004;134(12 Suppl):3479S-3485S.
129. Melse-Boonstra A. Bioavailability of micronutrients from nutrient-dense whole foods: zooming in on dairy, vegetables, and fruits. *Front Nutr.* 2020;7(July):101.
130. Sardinha AN, Canella DS, Martins APB, Claro RM, Levy RB. Dietary sources of fiber intake in Brazil. *Appetite.* 2014;79(May 2008):134–8.
131. Khandpur N, Neri DA, Monteiro C, Mazur A, Frelut ML, Boyland E, et al. Ultra-processed food consumption among the paediatric population: an overview and call to action from the European Childhood Obesity Group. *Ann Nutr Metab.* 2020;76(2):109–13.
132. Hall KD, Ayuketah A, Brychta R, Cai H, Cassimatis T, Chen KY, et al. Ultra-Processed diets cause excess calorie intake and weight gain: an inpatient randomized controlled trial of ad libitum food intake. *Cell Metab.* 2019;30(1):67-77.e3.
133. Silva A, Felício MB, Caldas APS, Miranda Hermsdorff HH, Bersch-Ferreira AC, Torreglosa CR, et al. Pro-inflammatory diet is associated with a high number of cardiovascular events and ultra-processed foods consumption in patients in secondary care. *Public Health Nutr.* 2020; Nov 5;1-10.
134. Vitelli-Storelli F, Rossi M, Pelucchi C, Rota M, Palli D, Ferraroni M, et al. Polyphenol intake and gastric cancer risk: Findings from the stomach cancer pooling project (stop). *Cancers (Basel).* 2020;12(10):1–12.
135. Schnabel L, Kesse-Guyot E, Allès B, Touvier M, Srouf B, Hercberg S, et al. Association between ultraprocessed food consumption and risk of mortality among middle-aged adults in France. *JAMA Intern Med.* 2019 Apr 1;179(4):490–8.
136. Yu G, Torres J, Hu N, Medrano-Guzman R, Herrera-Goepfert R, Humphrys MS, et al. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:302.
137. Yang J, Zhou X, Liu X, Ling Z, Ji F. Role of the gastric microbiome in gastric cancer: from carcinogenesis to treatment. *Front Microbiol.* 2021;12:641322.
138. Barra WF, Sarquis DP, Khayat AS, Khayat BCM, Demachki S, Anaissi AKM, et al. Gastric cancer microbiome. *Pathobiology.* 2021;88(2):156–69.
139. de Assumpção PP, Araújo TMT, de Assumpção PB, Barra WF, Khayat AS, Assumpção CB, et al. Suicide journey of *H. pylori* through gastric carcinogenesis: the role of non-*H. pylori* microbiome and potential consequences for clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Sep;38(9):1591–7.
140. Gao J-J, Zhang Y, Gerhard M, Mejias-Luque R, Zhang L, Vieth M, et al. Association between gut microbiota and helicobacter pylori-related gastric lesions in a high-risk population of gastric cancer. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:202.
141. Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F. The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Jan 20;30:11.

142. Chen XH, Wang A, Chu AN, Gong YH, Yuan Y. Mucosa-associated microbiota in gastric cancer tissues compared with non-cancer tissues. *Front Microbiol.* 2019;10(Jun):1–12.
143. Huang K, Gao X, Wu L, Yan B, Wang Z, Zhang X, et al. Salivary microbiota for gastric cancer prediction: an exploratory study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:640309.
144. Forsythe SJ, Dolby JM, Webster AD, Cole JA. Nitrate- and nitrite-reducing bacteria in the achlorhydric stomach. *J Med Microbiol.* 1988 Apr;25(4):253–9.
145. Oliveira J, Reygaert WC. Gram Negative Bacteria. *StatPearls.* 2021 Mar 29. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–.
146. Gunathilake M, Lee J, Choi IJ, Kim Y Il, Yoon J, Sul WJ, et al. Alterations in gastric microbial communities are associated with risk of gastric cancer in a Korean population: a case-control study. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):1–19.
147. Deng Y, Tang D, Hou P, Shen W, Li H, Wang T, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with esophageal cancer. *Microb Pathog.* 2021 Jan;150:104709.
148. Wang Q, Rao Y, Guo X, Liu N, Liu S, Wen P, et al. Oral microbiome in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):19055.
149. Yoshida A, Bouziane A, Erraji S, Lakhdar L, Rhissassi M, Miyazaki H, et al. Etiology of aggressive periodontitis in individuals of African descent. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021 Nov;57:20–6.
150. Carda-Diéguez M, Bravo-González LA, Morata IM, Vicente A, Mira A. High-throughput DNA sequencing of microbiota at interproximal sites. *J Oral Microbiol.* 2020;12(1):1687397.
151. Dordević D, Jančíková S, Vítězová M, Kushkevych I. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. *J Adv Res.* 2021 Jan;27:55–69.
152. Yazici C, Wolf PG, Kim H, Cross T-WL, Vermillion K, Carroll T, et al. Race-dependent association of sulfidogenic bacteria with colorectal cancer. *Gut.* 2017;66(11):1983–94.
153. Blachier F, Andriamihaja M, Larraufie P, Ahn E, Lan A, Kim E. Production of hydrogen sulfide by the intestinal microbiota and epithelial cells and consequences for the colonic and rectal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2021;320(2):G125–35.
154. Tsay J-CJ, Wu BG, Badri MH, Clemente JC, Shen N, Meyn P, et al. Airway microbiota is associated with upregulation of the PI3K pathway in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(9):1188–98.
155. Lee J-Y, Jacob KM, Kashefi K, Reguera G. Oral seeding and niche-adaptation of middle ear biofilms in health. *Biofilm.* 2021 Dec;3:100041.
156. Sung JJY, Coker OO, Chu E, Szeto CH, Luk STY, Lau HCH, et al. Gastric microbes associated with gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia 1 year after *Helicobacter pylori* eradication. *Gut.* 2020;69(9):1572–80.
157. Hespell RB, Paster BJ, Dewhirst FE. The genus *selenomonas*. In: *The prokaryotes*. New York: Springer; 2006. p.982–90. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/0-387-30744-3_33
158. Xu J, Xiang C, Zhang C, Xu B, Wu J, Wang R, et al. Microbial biomarkers of common tongue coatings in patients with gastric cancer. *Microb Pathog.* 2019 Feb;127:97–105.
159. Zhang X, Li C, Cao W, Zhang Z. Alterations of gastric microbiota in gastric cancer and precancerous stages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:559148.
160. Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science.*

- 2020;368(6494):973–80.
161. Rosier BT, Moya-Gonzalvez EM, Corell-Escuin P, Mira A. Isolation and characterization of nitrate-reducing bacteria as potential probiotics for oral and systemic health. *Front Microbiol.* 2020;11:555465.
 162. Rosier BT, Buetas E, Moya-Gonzalvez EM, Artacho A, Mira A. Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. *Sci Rep.* 2020;10(1):12895.
 163. Jockel-Schneider Y, Goßner SK, Petersen N, Stölzel P, Hägele F, Schweiggert RM, et al. Stimulation of the nitrate-nitrite-NO-metabolism by repeated lettuce juice consumption decreases gingival inflammation in periodontal recall patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2016;43(7):603–8.
 164. Jockel-Schneider Y, Schlagenhaut U, Stölzel P, Goßner S, Carle R, Ehmke B, et al. Nitrate-rich diet alters the composition of the oral microbiota in periodontal recall patients. *J Periodontol.* 2021 Mar 20;
 165. Jost L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology.* 2007 Oct;88(10):2427–39.
 166. Bonilla-Rosso G, Eguiarte LE, Romero D, Travisano M, Souza V. Understanding microbial community diversity metrics derived from metagenomes: performance evaluation using simulated data sets. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012 Oct;82(1):37–49.
 167. Tuomisto H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography (Cop).* 2010 Feb;33(1):2–22.
 168. Shao D, Vogtmann E, Liu A, Qin J, Chen W, Abnet CC, et al. Microbial characterization of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardia adenocarcinoma from a high-risk region of China. *Cancer.* 2019;125(22):3993–4002.
 169. Sarhadi V, Mathew B, Kokkola A, Karla T, Tikkanen M, Rautelin H, et al. Gut microbiota of patients with different subtypes of gastric cancer and gastrointestinal stromal tumors. *Gut Pathog.* 2021 Feb 17;13(1):11.
 170. Liu X, Shao L, Liu X, Ji F, Mei Y, Cheng Y, et al. Alterations of gastric mucosal microbiota across different stomach microhabitats in a cohort of 276 patients with gastric cancer. *EBioMedicine.* 2019 Feb;40:336–48.
 171. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13;486(7402):207–14.
 172. Yu C, Su Z, Li Y, Li Y, Liu K, Chu F, et al. Dysbiosis of gut microbiota is associated with gastric carcinogenesis in rats. *Biomed Pharmacother.* 2020 Jun;126:110036.
 173. Liu X-B, Gao Z-Y, Sun C-T, Wen H, Gao B, Li S-B, et al. The potential role of *P.gingivalis* in gastrointestinal cancer: a mini review. *Infect Agent Cancer.* 2019;14:23.
 174. Guilloux C-A, Lamoureux C, Beauruelle C, Héry-Arnaud G. *Porphyromonas*: A neglected potential key genus in human microbiomes. *Anaerobe.* 2021 Apr;68:102230.
 175. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr.* 2015 Apr;54(3):325–41.
 176. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):325–33.
 177. Sheflin AM, Melby CL, Carbonero F, Weir TL. Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. *Gut Microbes.* 2017;8(2):113–29.
 178. Basson AR, Ahmed S, Almutairi R, Seo B, Cominelli F. Regulation of intestinal inflammation by soybean and soy-derived compounds. *Foods (Basel, Switzerland).*

- 2021 Apr 4;10(4).
179. Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Rev.* 2014 Jul;72(7):429–52.
 180. Ahn-Jarvis JH, Parihar A, Doseff AI. Dietary flavonoids for immunoregulation and cancer: food design for targeting disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2019 Jun 29;8(7).
 181. P NP V, Joye IJ. Dietary fibre from whole grains and their benefits on metabolic health. *Nutrients.* 2020 Oct 5;12(10):3045.
 182. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr.* 2017;105(1):10–22.
 183. Mustafa SE, Mustafa S, Ismail A, Abas F, Abd Manap MY, Ahmed Hamdi OA, et al. Impact of prebiotics on equol production from soymilk isoflavones by two *Bifidobacterium* species. *Heliyon.* 2020 Oct;6(10):e05298.
 184. Volokh O, Klimentenko N, Berezhnaya Y, Tyakht A, Nesterova P, Popenko A, et al. Human gut microbiome response induced by fermented dairy product intake in healthy volunteers. *Nutrients.* 2019 Mar 4;11(3):547.
 185. do Prado SBR, Minguzzi BT, Hoffmann C, Fabi JP. Modulation of human gut microbiota by dietary fibers from unripe and ripe papayas: Distinct polysaccharide degradation using a colonic in vitro fermentation model. *Food Chem.* 2021 Jun 30;348:129071.
 186. Cueva C, Gil-Sánchez I, Ayuda-Durán B, González-Manzano S, González-Paramás AM, Santos-Buelga C, et al. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules.* 2017 Jan 6;22(1):99.
 187. Chiu H-F, Venkatakrisnan K, Golovinskaia O, Wang C-K. Gastroprotective effects of polyphenols against various gastro-intestinal disorders: a mini-review with special focus on clinical evidence. *Molecules.* 2021 Apr 6;26(7):2090.
 188. Cueva C, Silva M, Pinillos I, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Interplay between dietary polyphenols and oral and gut microbiota in the development of colorectal cancer. *Nutrients.* 2020 Feb 27;12(3):625.
 189. Assumpção PP, Barra WF, Ishak G, Coelho LGV, Coimbra FJF, Freitas HC, et al. The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma. *BMC Gastroenterol.* 2020 Jul 13;20(1):223.
 190. Olsen I, Yilmaz Ö. Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. *J Oral Microbiol.* 2019;11(1):1563410.
 191. Irfan M, Delgado RZR, Frias-Lopez J. The oral microbiome and cancer. *Front Immunol.* 2020;11:591088.
 192. Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:1533033819867354.
 193. Karpiński TM. The Microbiota and pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019;48(3):447–64.
 194. Xu S, Xiang C, Wu J, Teng Y, Wu Z, Wang R, et al. Tongue coating bacteria as a potential stable biomarker for gastric cancer independent of lifestyle. *Dig Dis Sci.* 2020 Oct 12;
 195. Teles FRF, Alawi F, Castilho RM, Wang Y. Association or causation? exploring the oral microbiome and cancer links. *J Dent Res.* 2020;99(13):1411–24.
 196. Riley DR, Sieber KB, Robinson KM, White JR, Ganesan A, Nourbakhsh S, et al. Bacteria-human somatic cell lateral gene transfer is enriched in cancer samples. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(6):e1003107.
 197. Mukaka MM. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in

- medical research. *Malawi Med J.* 2012 Sep;24(3):69–71.
198. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesth Analg.* 2018;126(5):1763–8.
 199. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish J Emerg Med.* 2018 Sep;18(3):91–3.
 200. Liu B, Wang W, Zhu X, Sun X, Xiao J, Li D, et al. Response of gut microbiota to dietary fiber and metabolic interaction with SCFAs in piglets. *Front Microbiol.* 2018;9:2344.
 201. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016;65(11):1812–21.
 202. Tetz G V, Ruggles K V, Zhou H, Heguy A, Tsirigos A, Tetz V. Bacteriophages as potential new mammalian pathogens. *Sci Rep.* 2017;7(1):7043.
 203. Mao S, Zhang M, Liu J, Zhu W. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Sci Rep.* 2015 Nov 3;5:16116.
 204. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J.* 2009 May 13;420(2):211–9.
 205. Guo T, Wang Z lan, Guo L, Li F, Li F. Effects of supplementation of nonforage fiber source in diets with different starch levels on growth performance, rumen fermentation, nutrient digestion and microbial flora of Hu lambs. *Transl Anim Sci.* 2021 Apr 16; 5(2):txab06.
 206. Xue K, Liu Y, Iversen KN, Mazidi M, Qu Z, Dong C, et al. Impact of a fermented high-fiber rye diet on helicobacter pylori and cardio-metabolic risk factors: a randomized controlled trial among helicobacter pylori-positive Chinese adults. *Front Nutr.* 2020;7:608623.
 207. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, et al. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007 Mar;132(3):1009–23.
 208. Ito N, Tsujimoto H, Ueno H, Xie Q, Shinomiya N. *Helicobacter pylori*-mediated immunity and signaling transduction in gastric cancer. *J Clin Med.* 2020 Nov 18;9(11):3699.
 209. Sánchez-Alonzo K, Silva-Mieres F, Arellano-Arriagada L, Parra-Sepúlveda C, Bernasconi H, Smith CT, et al. Nutrient deficiency promotes the entry of *Helicobacter pylori* cells into candida yeast cells. *Biology (Basel).* 2021 May 12;10(5):426.
 210. Huang Y, Ding Y, Xu H, Shen C, Chen X, Li C. Effects of sodium butyrate supplementation on inflammation, gut microbiota, and short-chain fatty acids in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Helicobacter.* 2021 Apr;26(2):e12785.
 211. Nakazawa F, Sato M, Poco SE, Hashimura T, Ikeda T, Kalfas S, et al. Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al. 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Mar;50 Pt 2:679–88.
 212. Zhu L, Liao R, Tu W, Lu Y, Cai X. Pyrodextrin enhances intestinal function through changing the intestinal microbiota composition and metabolism in early weaned piglets. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 May;104(9):4141–54.
 213. Long C, de Vries S, Venema K. Differently pre-treated rapeseed meals affect in vitro swine gut microbiota composition. *Front Microbiol.* 2020;11:570985.
 214. Alfa MJ, Strang D, Tappia PS, Graham M, Van Domselaar G, Forbes JD, et al. A

- randomized trial to determine the impact of a digestion resistant starch composition on the gut microbiome in older and mid-age adults. *Clin Nutr.* 2018;37(3):797–807.
215. Fei Y, Wang Y, Pang Y, Wang W, Zhu D, Xie M, et al. Xylooligosaccharide modulates gut microbiota and alleviates colonic inflammation caused by high fat diet induced obesity. *Front Physiol.* 2019;10:1601.
 216. Eisele Y, Mallea PM, Gigic B, Stephens WZ, Warby CA, Buhrke K, et al. *Fusobacterium nucleatum* and clinicopathologic features of colorectal cancer: results From the Colo Care Study. *Clin Colorectal Cancer.* 2021 Feb 27; Online ahead of print.
 217. Hanus M, Parada-Venegas D, Landskron G, Wielandt AM, Hurtado C, Alvarez K, et al. Immune system, microbiota, and microbial metabolites: the unresolved triad in colorectal cancer microenvironment. *Front Immunol.* 2021;12:612826.
 218. Kang S, You HJ, Lee Y-G, Jeong Y, Johnston T V, Baek N-I, et al. Production, structural characterization, and in vitro assessment of the prebiotic potential of butyl-fructooligosaccharides. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 10;21(2):445.
 219. Anand S, Kaur H, Mande SS. Comparative in silico analysis of butyrate production pathways in gut commensals and pathogens. *Front Microbiol.* 2016;7:1945.
 220. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017;19(1):29–41.
 221. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012 Feb;6(2):320–9.
 222. Li A, Chen Y, Schuller AA, van der Sluis LWM, Tjakkes G-HE. Dietary inflammatory potential is associated with poor periodontal health: a population-based study. *J Clin Periodontol.* 2021 Apr 25;48(7):907-18.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Projeto Temático



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE-HOSPITAL DO
CÂNCER A C CAMARGO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Genômica de Adenocarcinomas Gástricos

Pesquisador: Emmanuel Dias-Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50523015.6.0000.5432

Instituição Proponente: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.373.212

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As considerações feitas no parecer anterior foram acatadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi acrescentado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a perda de confidencialidade.

Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 1.373.212

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_616050.pdf	03/12/2015 16:38:44		Aceito
Outros	reply_CEP_gastric_031215.pdf	03/12/2015 16:38:06	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_tematico_estomago_031215.doc	03/12/2015 16:35:17	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	onco_clinica_ciencia.PDF	28/10/2015 14:11:52	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_infraestrutura_onco_clinica.PDF	28/10/2015 14:10:10	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_dirigente.pdf	27/10/2015 15:46:59	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_cirurgia_abdominal.pdf	27/10/2015 15:39:18	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Orçamento	orcamento_CEP_151027.pdf	27/10/2015 13:57:54	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_comprometimento_CIPE.pdf	27/10/2015 10:55:14	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	formulario_submissao_CEP_151026.pdf	26/10/2015 19:13:50	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Cronograma	cronograma_CEP_151026.pdf	26/10/2015 19:02:43	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_tematico_estomago_221015_VF.doc	26/10/2015 18:45:04	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_sobre_uso_e_destino_do_material_biologico.PDF	26/10/2015 16:32:33	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	Declaracao_sobre_dados_coletados.PDF	26/10/2015 16:31:57	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	Declaracao_sobre_a_publicacao_dos_dados_de_pesquisa.PDF	26/10/2015 16:30:19	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	Identificacao_dos_Curriculos_na_Plataforma_Lattes.PDF	26/10/2015 16:28:27	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	Declaracao_sobre_plano_de_recrutamento_dos_participantes_de_pesquisas.PDF	26/10/2015 16:26:31	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_do_pesquisador_com_resolucoes_do_Conselho_	26/10/2015 16:24:48	Emmanuel Dias-Neto	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 1.373.212

Outros	Nacional_da_Saude.PDF	26/10/2015 16:24:48	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_e_Comprometimento_Oncogenetica.PDF	26/10/2015 16:19:32	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_e_Comprometimento_Endoscopia.PDF	26/10/2015 16:18:46	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_e_Comprometimento_Cirurgia_Abdominal.PDF	26/10/2015 16:18:15	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_e_Comprometimento_Biobanco.PDF	26/10/2015 16:17:49	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_Anatomia_Patologica.pdf	26/10/2015 16:14:20	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_CIPE.pdf	26/10/2015 16:11:22	Emmanuel Dias-Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Tematico_para_CEP_221015.docx	26/10/2015 16:06:06	Emmanuel Dias-Neto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 17 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Jefferson Luiz Gross
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

Anexo 2. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa referente a esse projeto



São Paulo, 07 de junho de 2019.

Ao

Dr. Emmanuel Dias Neto

Aluno: Lucas Oliveira Monção (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2134/15G

"Avaliação da composição da microbiota gástrica e sua correlação com o conteúdo de fibras na dieta de pacientes com adenocarcinoma gástrico e controles sem câncer."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/06/2019, tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático "Genômica de Adenocarcinomas Gástricos.", registrado neste CEP sob nº. 2134/15. O projeto afiliado em referência será Mestrado do aluno Lucas Oliveira Monção, sob orientação da Dra. Diana Noronha Nunes.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano

1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 4. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para controles – Dados epidemiológicos



**A.C. Camargo
Cancer Center**

ID:ACCCC[...]

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
PARA CONTROLES
RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS**

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU-
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PARTICIPANTE: SEXO: M F
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:
DATA NASCIMENTO: Nº APTO:
ENDEREÇO: CIDADE:
BAIRRO: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): SEXO: M F
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:
DATA NASCIMENTO: Nº APTO:
ENDEREÇO: CIDADE:
BAIRRO: TELEFONE: DDD (.....)

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
EPIDEMIOLOGIA DOS ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS NO BRASIL

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
MARIA PAULA CURADO

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
• **Maria Paula Curado – Departamento de Epidemiologia do A.C. Camargo Cancer Center**

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:
60 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O(A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa ("Epidemiologia dos Adenocarcinomas Gástricos no Brasil"), que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.
O participante será abordado no Departamento de Cirurgia Abdominal e Campanha de Prevenção de Câncer do AC Camargo Cancer Center.

Rúbrica do pesquisador responsável. *Maria Paula Curado*

Rúbrica do participante:



IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Identificar os fatores de risco epidemiológicos e analisar a sobrevida dos casos de câncer de estômago nestas 3 capitais brasileiras São Paulo, Belém e Fortaleza.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Apesar de sua patogenia bem determinada, o conhecimento atual dos mecanismos moleculares que promovem sua gênese e evolução do câncer gástrico não foi traduzido em um impacto insignificante no tratamento ou diagnóstico personalizado e novas modalidades de tratamento ainda não conseguiram alterar o curso natural da doença. Este projeto visa aumentar de modo significativo o conhecimento da clinico acerca desta patologia no Brasil, investigando os fatores de risco epidemiológicos em estados brasileiros em um estudo multicêntrico do tipo caso-controle.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo de caso e controles de base hospitalar multicêntrico. Casos: pacientes com diagnóstico confirmado de adenocarcinoma gástrico; Controles -1: pessoas submetidas a endoscopia gástrica com diagnóstico negativo para neoplasia gástrica (ACCamargo), Controles -2: Hospital ACCamargo serão recrutados da campanha de prevenção enquanto que nos demais centros serão de origem hospitalar não oriundos de clínica de tratamento de oncológico.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que você participe de uma entrevista sobre o seu estilo de vida e hábitos alimentares. Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações clínicas relevantes do seu prontuário médico (estadiamento clínico). Se você decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Um entrevistador virá aplicar os questionários enquanto você estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e meia e consiste de questões relacionadas a estilo de vida e hábitos alimentares.

Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para você. Não haverá nenhum custo financeiro para você participar neste estudo. Não há nenhuma compensação ou pagamento pela participação nas entrevistas.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

O(s) questionário(s) poderá (ão) causar um sentimento de desconforto ou ansiedade frente às perguntas realizadas. Os pesquisadores estarão disponíveis para conversar e prestar apoio se necessários, frente a estas situações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não haverá benefícios diretos para você que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Marcos Paulo Carvalho

Rúbrica do
participante:



X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (011) 2189-5000 – ramais: 2942 entrar em contato com Dra. Maria Paula Curado ou Rodolfo Cezar.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr(a). Maria Paula Curado
Departamento de Epidemiologia do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramais 2942 / 5178
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
(Dra. Maria Paula Curado)

_____/_____/_____
Data



Anexo 5. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para casos e controles para amostras biológicas



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Projeto: Aspectos Genômicos de Adenocarcinomas Gástricos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Número do Protocolo:
Título do Estudo: Aspectos Genômicos de Adenocarcinomas Gástricos
Nome completo do Pesquisador: Dr. Emmanuel Dias-Neto
Nome da Instituição: A.C. Camargo Cancer Center
Telefone do pesquisador: (11) 2189-5023

Nome do Participante: _____

RGH: _____ N° de Identificação no estudo: _____

DADOS SOBRE O ESTUDO

Este é um projeto de pesquisa do Centro Internacional de Pesquisas e do Núcleo de Cirurgia Abdominal do AC Camargo Cancer Center, está sob responsabilidade do Dr. Emmanuel Dias-Neto.

Todos os estudos de pesquisa devem ser aprovados por um comitê de ética em pesquisa antes que qualquer sujeito possa participar. O comitê de ética ajuda a proteger os interesses dos sujeitos em estudos de pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa A. C. Camargo Cancer Center.

EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Convidamos você a participar deste estudo, que visa compreender as bases do desenvolvimento do câncer de estômago. Apesar de vários estudos já terem sido feitos, ainda faltam análises específicas que poderão ajudar a compreender por que o câncer se desenvolve, quão agressivo ele será e quais os pacientes que devem se beneficiar do tratamento quimioterápico antes da cirurgia. Ainda não sabemos também sobre a importância ou influência da mistura de raças no comportamento dos tumores, mas hoje dispomos de tecnologias modernas que permitem avaliar estas questões e contribuir para o melhor conhecimento desta doença.

Objetivos da pesquisa

Este é um estudo sobre a importância de diversos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer gástrico. Neste estudo, usando amostras de pessoas saudáveis e de pessoas com câncer, avaliaremos as bactérias presentes no estômago, as alterações em substâncias importantes (como proteínas, e o material genético presente dentro das células, DNA e RNA) e aspectos relacionados à etnia ("raça" - europeia, africana, asiática ou outras, que podem ter contribuído para a sua formação).

Aspectos Genômicos de Adenocarcinomas Gástricos

TCLE versão 3.0 Abril/19



Em indivíduos saudáveis e também naqueles com de câncer de estômago, iremos avaliar estas alterações e como elas variam entre indivíduos dos grupos com e sem doença. Iremos comparar ainda as alterações características de indivíduos que tenham uma ocorrência frequente de câncer na família, indivíduos com melhor ou pior resposta ao tratamento por quimioterapia e indivíduos com tumores de comportamento mais agressivo versus menos agressivo. Análises destes dados podem ajudar na compreensão de um possível papel destes fatores no desenvolvimento do câncer.

Procedimentos que serão utilizados e propósitos

Caso aceite, você poderá participar de todos os estudos, ou de apenas algum deles, dependendo do momento em que você tiver sido contatado e conforme você se enquadre nos grupos a serem avaliados. Para o projeto que estuda as bactérias presentes no estômago é necessário que você tenha um pedido de um exame de endoscopia (um exame onde uma sonda é passada por sua boca, até atingir o estômago, e permite a sua visualização), que deve ter sido solicitado pelo seu médico pessoal. Esclarecemos que o exame não é solicitado por um médico deste estudo e os seus custos não serão cobertos por este estudo. Neste exame o interior do seu estômago será analisado para ver se existem alterações. É feito um procedimento de lavagem do interior do estômago. Após a lavagem, o líquido é normalmente aspirado e jogado em lixo adequado. Se obtivermos a sua autorização, ao invés de descartarmos este líquido no lixo, ele será usado para os estudos. Para os demais estudos você pode participar na condição de um controle (sem diagnóstico de câncer) ou ainda caso o câncer de estômago tenha sido diagnosticado em você ou em membros da sua família. Neste caso, de acordo com o grupo do estudo em que você se enquadre, solicitamos sua autorização para a coleta de uma pequena amostra de saliva, de sangue (usando procedimentos de rotina) ou, quando for o caso, de pequenos fragmentos do tumor obtidos na rotina do seu tratamento ou de seus exames. Em nenhum caso a coleta destas amostras irá prejudicar o seu diagnóstico nem o seu tratamento.

Caso aceite participar do estudo você deverá:

- Ter mais que 18 anos de idade;

Quando você receber este formulário, explicaremos a você quais as razões da pesquisa e seu objetivo. Possivelmente outros pesquisadores do AC Camargo devem te contatar para obter outras informações tais como alguns hábitos comuns tais como o que você geralmente come, bebe, se faz uso de cigarro ou bebidas com álcool, medicamentos e outros.

Caso concorde em participar, por favor, assine este Termo de Consentimento em 2 vias. Uma ficará em seu poder e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o seu tratamento. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde durante o tratamento. A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte da amostra coletada, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou a seu tratamento.

Estudos a serem realizados e material necessário (marque nos quadros se você aceita participar, se não



deseja participar, ou se o estudo não se aplica – caso o procedimento necessário não se aplique ao seu caso, conforme orientação que você terá recebido no momento de preenchimento deste documento)

1) Avaliação das bactérias presentes no estômago e sua relação com o desenvolvimento do câncer de estômago. Amostra necessária: suco gástrico normalmente coletado durante a endoscopia, e que seria jogado fora. O que faremos: iremos determinar quais as bactérias podem ser encontradas em seu estômago e avaliaremos se elas podem ser associadas ao surgimento do câncer.

aceito; não aceito; não se aplica.

2) Avaliação de alternativas de diagnóstico usando compostos voláteis (elementos que evaporam) derivados da respiração ou que podem exalar a partir do suco gástrico. Amostra necessária: 1) suco gástrico normalmente coletado durante a endoscopia (como descrito acima), e 2) um pouco do ar que você exala quando respira. O que faremos: 1) serão avaliados os compostos que evaporam do suco gástrico, usando um aparelho específico; pediremos para você soprar através de um canudo estéril e novo, para coletarmos e analisarmos compostos presentes na respiração. Os resultados talvez ajudem no desenvolvimento de testes simples e baratos para diagnosticar pacientes no futuro.

aceito; não aceito; não se aplica.

3) Avaliação de alterações de DNA relacionadas ao desenvolvimento do câncer (incluindo câncer familiar) ou aspectos de etnia (raça). Amostra necessária: uma pequena quantidade de saliva (cerca de 2mL) ou 15 mL de sangue (equivalente a uma colher de sopa) de sangue coletado de uma veia do braço. O que faremos: no DNA obtido buscaremos alterações relacionadas com o desenvolvimento do câncer em função da raça (etnia) determinada por análise de DNA.

aceito; não aceito; não se aplica.

4) Avaliação de marcadores de resposta à quimioterapia. Amostra necessária: pequenos pedaços do tumor (coletados antes ou depois da quimioterapia) após diagnóstico; e 15 mL (equivalente a uma colher de sopa) de sangue coletado de uma veia do braço. As coletas de sangue poderão ser feitas em diferentes momentos do tratamento/acompanhamento médico. O que faremos: buscaremos alterações de substâncias (DNA, RNA ou proteínas) no material coletado, e no sangue buscaremos células tumorais.

aceito; não aceito; não se aplica.

5) Determinação de agressividade tumoral. Amostra necessária: pequenos pedaços do tumor, coletados normalmente no exame de endoscopia antes da quimioterapia, 15 mL (equivalente a uma colher de sopa) de sangue coletado de uma veia do braço. O que faremos: buscaremos alterações de substâncias (DNA, RNA ou proteínas) no material coletado.

aceito; não aceito; não se aplica.

Observação: caso você aceite participar de um ou mais estudos acima, que envolvam a coleta de sangue (estudos 3, 4 e 5), esclarecemos que uma única coleta inicial já atende a todos estes estudos. No entanto, coletas em outros momentos que você vier ao A.C. Camargo podem ser necessárias para os estudos 4 e 5.



Complicações e riscos esperados

Caso você aceite participar deste estudo, esclarecemos que não haverá nenhum custo além daqueles necessários para cobrir os exames solicitados por seu médico para a avaliação do seu caso. Caso você participe doando uma pequena amostra de sangue, as raras complicações associadas a esta coleta compreendem: dor pela picada da agulha, pequeno sangramento ou hematoma no local onde foi usada a agulha para coletar o sangue, mas este não deve causar nenhum mal. Todas as perguntas que serão feitas a você, e também o método de coleta de células e amostras que serão utilizados neste estudo foram previamente empregados em outros estudos.

Confidencialidade das informações

Todos os dados levantados serão usados apenas para pesquisa científica, visando a melhor compreensão do câncer de estômago. Todos os esforços serão feitos no sentido de manter a privacidade das informações, que ficarão restritas aos médicos, pesquisadores e enfermeiros diretamente envolvidos neste projeto. Neste sentido, todo e qualquer dado que possa levar à sua identificação será codificado, fazendo com que o risco de perda de confidencialidade seja mínimo.

Benefícios que poderão ser obtidos

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o surgimento ou a evolução do câncer de estômago, desta forma ajudando no desenvolvimento de métodos de prevenção.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido adequadamente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definidos acima, eu concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado: "Aspectos Genômicos de Adenocarcinomas Gástricos".

São Paulo, de _____ de 20____

Assinatura do participante ou responsável legal

Assinatura do pesquisador ou responsável pela aplicação do termo

Em caso de dúvida, entre em contato com o Dr. Emmanuel Dias-Neto, no Laboratório de Genômica Médica do A.C. Camargo Cancer Center, pelo telefone (11) 2189-5023.

Caso o pesquisador responsável não forneça informações/esclarecimentos suficientes, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente/A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5020. Este Comitê de Ética se localiza à Rua Prof. Antônio Prudente, 211, Liberdade; horário de atendimento: segunda-feira à sexta-feira das 8 às 17 horas. O Comitê de Ética em Pesquisa é um grupo formado por cientistas e não-cientistas que realizam a revisão ética inicial e contínua do estudo clínico para manter sua segurança e proteger seus direitos.

Apêndice 1 - Contribuição dos alimentos *in natura*/minimamente processados

Grupos e subgrupos da classificação NOVA de alimentos	Contribuição calórica dos alimentos de acordo com a classificação NOVA na ingestão energética diária						P valor
	Adenocarcinoma gástrico		Controle endoscópicos		Controles campanha		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	(%)		(%)		(%)		
In natura e minimamente processados	36,78	12,29	37,04	12,00	41,31	12,84	<0,001
Arroz branco	8,39	6,84	8,12	6,76	10,14	7,75	0,003
Café	7,56	6,72	5,68	4,79	6,28	5,32	0,043
Feijão	3,56	3,35	3,14	3,31	3,80	3,39	0,028
Aveia em flocos	2,43	6,06	2,17	6,10	3,02	7,20	0,597
Banana	2,39	2,67	3,04	3,19	3,06	2,64	<0,001
Laranja e mexerica	2,34	2,88	2,88	3,82	2,81	3,59	0,397
Leite integral	2,24	3,27	1,87	3,31	2,15	3,67	0,189
Maça e pera	0,86	1,17	1,00	1,65	0,89	1,20	0,92
Arroz integral	0,81	2,16	1,17	2,85	0,94	2,53	0,419
Ovo de galinha	0,74	1,07	0,73	1,00	1,12	2,72	0,147
Mamão	0,71	0,92	1,12	1,53	0,65	1,10	0,002
Manga	0,49	0,92	0,57	0,92	0,64	1,03	0,679
Abacate	0,47	0,94	0,53	1,11	0,44	0,95	0,388
Uva	0,46	0,73	0,64	1,05	0,48	0,82	0,104
Iogurte natural	0,39	0,99	0,58	1,48	0,29	0,94	0,011
Leite desnatado	0,30	1,02	0,55	1,45	0,47	1,57	0,162
Leite semi-desnatado	0,29	1,01	0,37	1,43	0,43	1,70	0,935
Melão e melancia	0,29	0,40	0,29	0,49	0,23	0,44	0,134
Abacaxi	0,23	0,52	0,24	0,79	0,23	0,49	0,317
Tomate	0,20	0,21	0,30	0,33	0,28	0,27	<0,001
Lentilha, ervilha e similares	0,18	0,51	0,20	0,58	0,17	0,53	0,009
Goiaba	0,17	0,60	0,16	0,63	0,28	1,35	0,0043
Caqui	0,15	0,52	0,25	0,76	0,41	0,98	0,025
Goma de tapioca	0,14	1,19	0,09	0,56	0,81	2,96	<0,001
Cebola	0,13	0,16	0,19	0,23	0,19	0,22	0,002
Alface	0,11	0,11	0,19	0,19	0,15	0,15	<0,001
Couve	0,10	0,15	0,11	0,18	0,11	0,15	0,203
Espinafre e escarola	0,09	0,17	0,15	0,36	0,14	0,27	0,422
Cenoura	0,09	0,13	0,15	0,18	0,12	0,14	0,001
beterraba	0,07	0,15	0,07	0,16	0,07	0,12	0,816
Chuchu	0,06	0,12	0,06	0,14	0,07	0,11	0,262
Berinjela	0,06	0,09	0,10	0,16	0,12	0,21	<0,001
Abóbora	0,05	0,10	0,06	0,12	0,06	0,10	0,835
Leite de vaca cru	0,04	0,58	0,00	0,00	0,01	0,28	0,629
Repolho	0,04	0,06	0,06	0,12	0,07	0,14	0,021
Agrião e rúcula	0,03	0,06	0,05	0,07	0,05	0,10	0,028
Frutas vermelhas	0,03	0,06	0,04	0,11	0,03	0,06	0,855
Abobrinha	0,02	0,04	0,04	0,08	0,03	0,04	0,019
Chás naturais	0,02	0,04	0,03	0,08	0,02	0,04	<0,001
Pepino	0,02	0,03	0,03	0,06	0,03	0,06	0,084
Couve flor e brócolis	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,021
Graviola	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,197

Apêndice 2 - Contribuição de alimentos processados

Grupos e subgrupos da classificação NOVA de alimentos	Contribuição calórica dos alimentos de acordo com o seu grau de processamento, baseado na ingestão energética diária						P valor
	Adenocarcinoma gástrico		Controle endoscópicos		Controles campanha		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	%		%		%		
% Processados	33,25	9,45	34,95	9,78	33,70	10,18	0,169
Carne assada, cozida	3,68	3,17	3,47	3,94	3,38	4,11	0,027
Óleo ou azeite para salada	2,75	3,47	4,81	4,92	4,65	4,51	<0,001
Carne com legumes	2,22	2,70	2,20	2,70	2,00	2,72	0,394
Frango ensopado, assado	2,00	2,15	2,40	3,34	2,59	2,67	0,025
Peixe assado, cozido	1,99	3,37	1,70	2,16	1,56	2,26	0,324
Suco natural	1,78	2,66	2,43	3,40	1,76	2,80	0,117
Castanhas	1,69	2,92	1,09	2,14	1,13	2,50	0,083
Carne bovina frita	1,61	2,38	1,23	1,85	1,27	2,33	0,025
Queijo amarelos	1,59	2,38	1,74	1,89	1,38	2,17	0,010
Bolo simples	1,37	2,35	1,20	2,28	1,62	2,30	0,083
Carne de porco	1,23	2,12	1,25	1,76	1,19	1,79	0,777
Frango frito	1,18	2,08	1,12	1,99	1,44	2,42	0,415
Batata, mandioca, inhame cozido ou assado	1,17	1,20	1,52	1,88	1,27	1,33	0,300
Ovo frito, omelete	1,16	1,12	1,53	2,46	1,52	2,26	0,992
queijo minas ou ricota	1,15	2,15	0,91	1,41	0,88	1,48	0,207
Vitamina de frutas	0,97	2,22	0,52	1,62	0,63	1,60	<0,001
Farofa e similares	0,92	2,06	0,69	1,48	0,81	1,64	0,339
Feijoadada, feijão tropeiro	0,87	1,28	0,85	1,76	0,46	0,75	<0,001
Churrasco	0,76	1,25	0,76	1,27	0,52	1,11	0,002
Batata, mandioca ou polenta	0,68	1,15	0,57	0,88	0,43	0,71	0,005
Iogurte de frutas	0,56	1,30	0,35	1,09	0,49	1,12	0,002
Sopa de legumes, canja	0,45	0,75	0,45	0,68	0,33	0,54	0,099
Peixe	0,38	0,66	0,41	0,78	0,35	0,68	0,740
Pipoca de panela	0,35	1,01	0,29	0,81	0,40	0,99	0,006
Salada de maionese	0,30	0,55	0,33	1,19	0,28	0,57	0,504
Leite zero lactose	0,13	1,02	0,20	1,42	0,10	0,86	0,612
Miúdos	0,13	0,30	0,14	0,40	0,09	0,26	0,011
Cerveja	0,12	0,67	0,50	1,58	0,57	1,86	<0,001
Vinagrete	0,06	0,13	0,15	0,53	0,11	0,33	0,262
Vinho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,001
leite em pó	0,00	0,00	0,18	2,37	0,49	4,15	0,218

Apêndice 3 - Contribuição de alimentos ultraprocessados na dieta

Grupos e subgrupos da classificação NOVA de alimentos	Contribuição calórica dos alimentos de acordo com o seu grau de processamento, baseado na ingestão energética diária						P valor
	Adenocarcinoma gástrico		Controle endoscópicos		Controles campanha		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	%		%		%		
Ultra processados	29,98	11,92	28,02	11,20	24,98	11,54	<0,001
Pão francês	5,44	4,39	5,84	5,96	5,05	5,07	0,138
Margarina, manteiga	3,27	3,00	3,62	3,24	2,86	3,05	0,003
Pizza	2,19	2,63	2,41	3,04	1,70	3,46	0,001
Biscoito sem recheio	2,03	2,84	1,19	2,41	1,77	2,71	<0,001
Sorvete industrializado	1,86	4,21	1,00	1,70	1,25	2,22	0,043
Gelatina	1,33	3,41	0,83	2,78	0,75	1,88	0,248
Salgados assados	1,24	2,07	1,21	1,79	0,84	1,67	0,004
Linguiça	1,21	1,42	1,37	2,31	1,23	1,57	0,844
Hot dog e sanduíches	1,11	2,28	0,72	1,66	0,44	1,09	<0,001
Pão integral	1,02	2,38	2,54	3,98	1,34	2,55	0,001
Refrigerante comum	1,02	2,90	0,71	1,66	0,67	2,35	0,791
Achocolatado em pó	0,94	3,35	0,65	2,55	0,59	2,88	0,106
Embutidos (presunto, peito de peru, mortadela e similares)	0,79	1,11	0,57	0,74	0,54	0,95	0,001
Salgados fritos (coxinha, rissole e bolinhos)	0,75	1,23	0,49	0,93	0,59	1,26	0,087
Macarrão com molho sem carne	0,67	1,52	0,73	0,98	0,74	0,90	0,037
Macarrão com molho e com carne	0,52	0,74	0,67	0,87	0,60	0,87	0,118
Bala e pirulito	0,45	1,05	0,19	0,74	0,34	1,35	<0,001
Bacon	0,42	1,05	0,31	0,83	0,27	0,67	0,057
Salsicha	0,41	0,91	0,15	0,33	0,29	0,66	0,011
Bolo recheado	0,37	1,03	0,40	1,19	0,50	1,51	0,514
Lasanha, canelone, panqueca e similares	0,36	0,58	0,46	0,72	0,28	0,52	0,021
Salgadinho (cheetos, doritos e similares)	0,32	1,06	0,16	0,71	0,16	0,57	0,006
Biscoito recheado	0,31	1,11	0,20	0,68	0,27	0,85	0,294
Carne seca e carne de sol	0,30	0,87	0,11	0,39	0,10	0,35	0,000
Doces de confeitaria	0,25	0,50	0,26	0,62	0,19	0,38	0,029
Macarrão instantâneo	0,21	0,83	0,07	0,31	0,12	0,36	0,010
Cereal matinal	0,21	0,77	0,23	0,68	0,16	0,65	0,030
Bebida a base de soja	0,17	0,87	0,04	0,28	0,08	0,49	0,174
Chá industrializado	0,13	0,82	0,18	1,08	0,43	1,57	<0,001
Leite de coco, chantilly, leite condensado	0,11	0,43	0,08	0,22	0,11	0,35	0,361
Pipoca de micro-ondas	0,10	0,50	0,06	0,22	0,06	0,28	0,016
Nuggets	0,08	0,22	0,05	0,25	0,14	0,57	0,027
Doce de frutas industrializado	0,07	0,19	0,07	0,29	0,07	0,30	0,206
Carne processada (hambúrguer, almondega e similares)	0,06	0,17	0,08	0,22	0,10	0,27	0,524
Molho para salada, patê	0,05	0,14	0,04	0,22	0,05	0,17	0,236
Catchup, mostarda	0,04	0,10	0,04	0,24	0,05	0,17	0,143
Sorvete diet	0,04	0,38	0,01	0,12	0,03	0,41	0,415
Iogurte diet	0,02	0,28	0,02	0,16	0,00	0,01	0,393
Achocolatado em pó diet	0,02	0,20	0,10	0,78	0,10	1,27	0,522
bebida a base de soja sem açúcar	0,02	0,20	0,01	0,14	0,02	0,17	0,907
Caipirinha e destilados	0,02	0,17	0,06	0,34	0,04	0,20	0,029
Sorvete industrializado light	0,01	0,15	0,01	0,13	0,03	0,51	0,916
Gelatina light	0,01	0,11	0,04	0,23	0,00	0,03	0,063
Gelatina diet	0,01	0,04	0,02	0,15	0,01	0,05	0,151

Molho Shoyo	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03	0,822
Sopa creme de legumes industrializado	0,00	0,03	0,00	0,02	0,01	0,12	0,443
Leite vegetal de soja	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,31	0,615

Apêndice 4 - Regressão logística multinomial univariada de fatores de estilo de vida e dietéticos

Variáveis	Grupos							
	Controles endoscópicos <i>versus</i> Adenocarcinoma Gástrico				Controle campanha <i>versus</i> Adenocarcinoma Gástrico			
	OR	95% IC		p	OR	95% IC		p
		Inferior	Superior			Inferior	Superior	
Sexo								
Masculino	1			1				
Feminino	1,110	0,731	1,686	0,624	1,174	0,824	1,675	0,375
Idade								
Até 40 anos	1			1				
De 45 a 60 anos	0,966	0,521	1,791	0,912	1,220	0,718	2,071	0,462
Acima de 60 anos	1,075	0,583	1,983	0,817	1,162	0,684	1,974	0,578
Estado civil								
Casado	1,000				1,000			
Divorciado/Separado	1,140	0,495	2,625	0,759	1,428	0,716	2,848	0,311
Solteiro	0,941	0,490	1,807	0,856	1,061	0,620	1,816	0,828
Viúvo e outros	1,614	0,743	3,507	0,226	0,779	0,365	1,661	0,518
Grau de instrução								
Analfabeto e < 5 anos	1				1			
Ensino fundamental	2,560	0,976	6,714	0,056	1,729	0,908	3,294	0,096
Ensino médio	3,079	1,285	7,378	0,012	1,680	0,949	2,977	0,075
Ensino superior	3,958	1,704	9,195	0,001	0,889	0,507	1,559	0,681
Moradia								
Própria	1				1			
Alugado	0,654	0,339	1,263	0,206	1,054	0,638	1,741	0,837
Emprestado e outros	3,678	0,993	13,627	0,051	5,011	1,500	16,739	0,009
Fornecido pelo governo/empresa	0,552	0,050	6,149	0,629	0,537	0,075	3,848	0,536
Etnia								
Branco	1				1			
Preto/Negro	0,378	0,117	1,220	0,104	3,556	1,791	7,060	0,000
Asiático	0,931	0,463	1,874	0,841	2,133	1,211	3,759	0,009
Pardo e outros	0,954	0,560	1,626	0,862	1,758	1,123	0,487	0,014
IMC								
Eutrofia	1				1			
Baixo peso/Desnutrição	0,163	0,063	0,424	0,000	0,571	0,324	1,007	0,053
Pré obesidade	1,220	0,729	2,042	0,450	1,113	0,708	1,750	0,641
Obesidade	0,842	0,463	1,532	0,574	0,990	0,596	1,645	0,969
Quartis alimentos <i>in natura</i>								
Quartil 1	1				1			
Quartil 2	1,163	0,674	2,009	0,587	1,769	1,088	2,876	0,022
Quartil 3	1,116	0,648	1,922	0,692	1,661	1,024	2,694	0,040
Quartil 4	1,087	0,595	1,986	0,787	3,025	1,824	5,016	0,000
Quartis alimentos processados								
Quartil 1	1				1			
Quartil 2	0,760	0,425	1,357	0,353	1,250	0,752	2,079	0,389
Quartil 3	1,003	0,564	1,784	0,992	0,921	0,567	1,495	0,738
Quartil 4	1,559	0,868	2,800	0,137	0,808	0,502	1,299	0,378
Quartis alimentos ultra processados								
Quartil 4	1				1			
Quartil 3	0,941	0,548	1,615	0,825	1,210	0,754	1,941	0,430
Quartil 2	1,296	0,743	2,261	0,361	1,817	1,114	2,963	0,017
Quartil 1	1,529	0,832	2,811	0,171	3,290	1,953	5,545	0,000

Quartil Fibra alimentar total

Quartil 1	1				1				
Quartil 2	0,910	0,511	1,621	0,750	1,004	0,627	1,608	0,988	
Quartil 3	1,157	0,654	2,049	0,616	1,090	0,676	1,760	0,723	
Quartil 4	2,264	1,248	4,107	0,007	1,983	1,181	3,330	0,010	

Quartil Fibra solúvel

Quartil 1	1				1				
Quartil 2	1,326	0,746	2,358	0,336	1,055	0,656	1,697	0,826	
Quartil 3	1,506	0,853	2,661	0,158	1,063	0,659	1,714	0,802	
Quartil 4	2,233	1,217	4,096	0,009	2,216	1,334	3,681	0,002	

Quartil Fibra insolúvel

Quartil 1	1,000				1				
Quartil 2	1,116	0,617	2,016	0,717	1,590	0,991	2,552	0,054	
Quartil 3	1,575	0,907	2,735	0,107	1,197	0,744	1,926	0,458	
Quartil 4	2,591	1,427	4,707	0,002	2,606	1,557	4,362	<0,001	

Uso de omeprazol, ranitidina, pantoprazol e similares

Sim	1				1				
Não	2,439	1,602	3,713	0,000	10,183	6,756	15,348	0,000	

Anti ácidos

Sim	1				1				
Não	1,252	0,749	2,092	0,392	17,338	7,220	41,634	0,000	

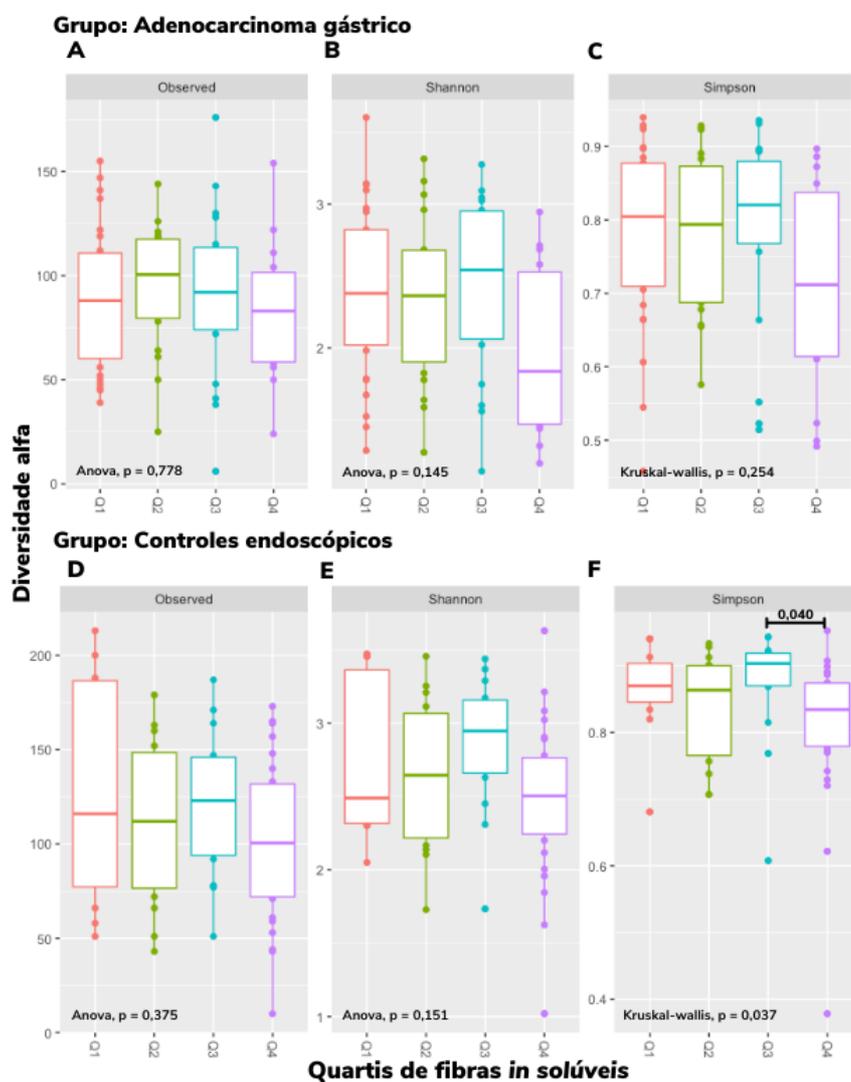
Diabetes

Sim	1				1				
Não	1,306	0,738	2,312	0,359	1,389	0,859	2,245	0,180	

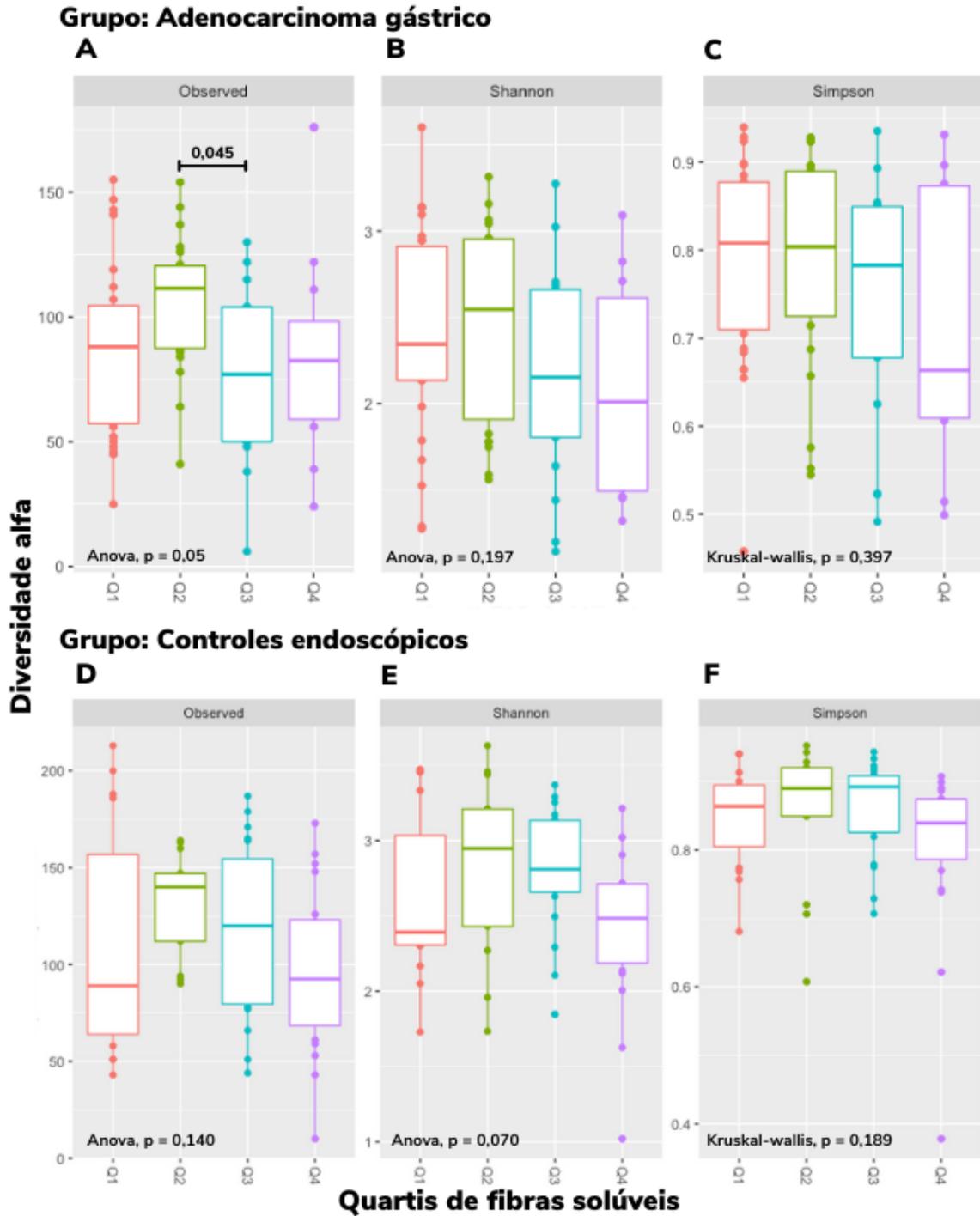
Carga tabagica

<30 maços por ano	1				1				
>30 maços por ano	0,356	0,200	0,633	0,000	0,309	0,193	0,495	0,000	

Apêndice 5 - Diversidade alfa entre os quartis e fibras insolúveis. **Nota.** Após testar normalidade dos dados, foram utilizados os testes de Anova e *Kruskal-wallis*. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

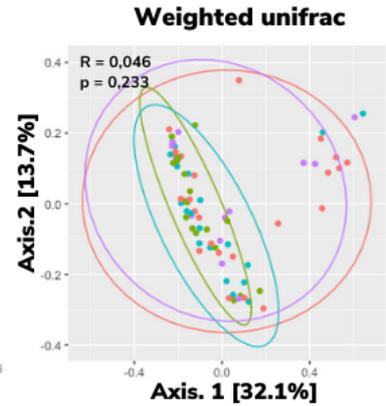
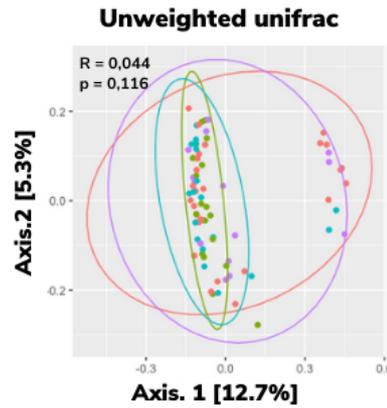
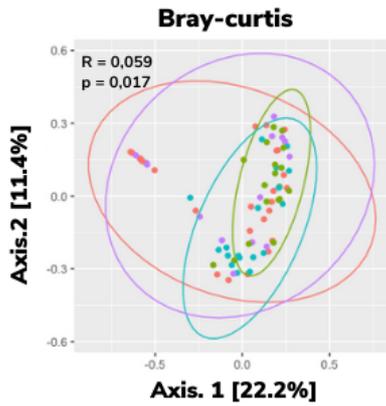


Apêndice 6 - Diversidade alfa entre os quartis e fibras solúveis. Nota. Após testar normalidade dos dados, foram utilizados os testes de Anova e *Kruskal-wallis*. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

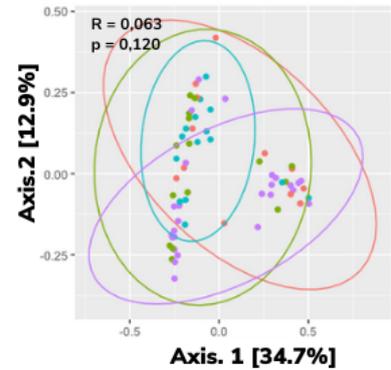
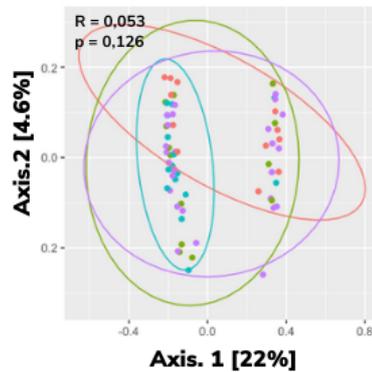
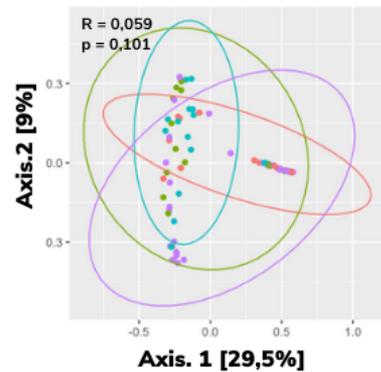


Apêndice 7 - Diversidade beta entre os quartis e fibras in solúveis entre casos e controles endoscópicos. **Nota.** O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Adenocarcinoma gástrico



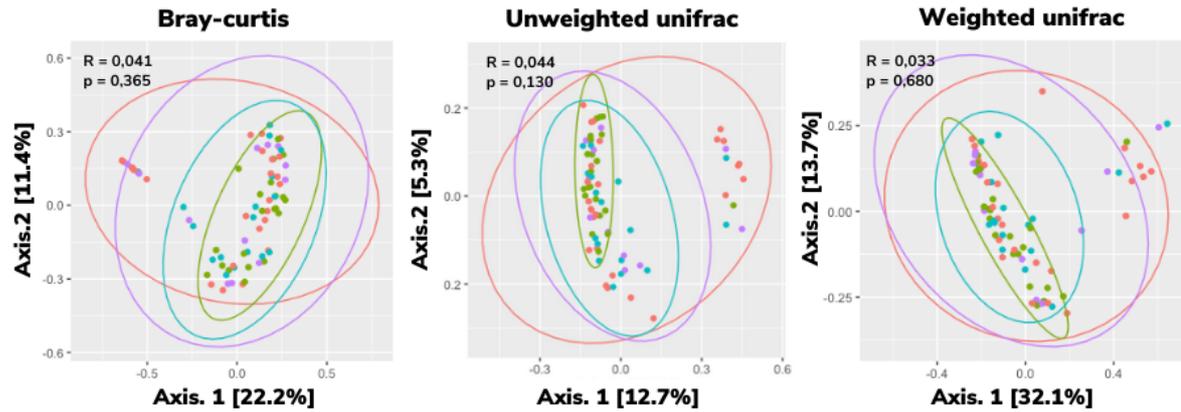
Controles endoscópicos



● Q1 ● Q2 ● Q3 ● Q4
Quartis de fibras in solúveis

Apêndice 8 - Diversidade beta entre os quartis e fibras in solúveis entre casos e controles endoscópicos. **Nota.** O teste não paramétrico ANOSIM foi utilizado para avaliar a similaridade entre as amostras. R representa o coeficiente de correlação. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Adenocarcinoma gástrico



Controles endoscópicos

