

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

ÁBNER SOUZA PAZ

**EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA
INTESTINAL, ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E
IMUNOLÓGICO DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS
POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO – PRONIC-G**

MANAUS

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

ÁBNER SOUZA PAZ

**EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA
INTESTINAL, ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E
IMUNOLÓGICO DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS
POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO – PRONIC-G**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA/UFAM) como requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Valquíria do Carmo Alves Martins

MANAUS

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P348e Paz, Ábner Souza
Efeitos do uso de probióticos na microbiota intestinal, estado clínico-nutricional e imunológico de pacientes gastrectomizados por câncer gástrico : um ensaio clínico randomizado – PRONIC-G / Ábner Souza Paz . 2024
187 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Fernando Marques Barcellos
Coorientadora: Valquíria do Carmo Alves Martins
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. neoplasia gástrica. 2. câncer. 3. microbioma gastrointestinal. 4. estados imunológicos. 5. fatores imunológicos. I. Barcellos, José Fernando Marques. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ÁBNER SOUZA PAZ

**EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL,
ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
GASTRECTOMIZADOS POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO
CLÍNICO RANDOMIZADO – PRONIC-G**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA/UFAM) como requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof.^a Dr.^a Kátia Luz Torres Silva

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof.^a Dr.^a Ana Rita Gaia Machado

Centro Universitário – FAMETRO

Prof.^a Dr.^a Celsa da Silva Moura Souza

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Sidney Raimundo Silva Chalub

Fundação Centro de Controle de Oncologia do AM – FCECON

RESUMO

Introdução: O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia mais frequente no mundo, com mais de 1 milhão de novos casos por ano. A etiologia mais aceita se baseia na influência da mutação tecidual promovida por uma bactéria da microbiota comensal gástrica chamada *H. pylori*. O tratamento padrão ouro para o CG é a cirurgia de remoção total ou parcial do estômago, procedimento que tem grande poder de modificar a microbiota humana, cujas mudanças ainda são pouco compreendidas no Amazonas. Diversos fatores podem também contribuir para alterações da microbiota intestinal em pacientes com câncer gástrico, o que pode culminar tanto na piora de desfechos clínicos quanto na modificação do perfil da microbiota intestinal, aliado ao comprometimento do padrão de resposta imunológica, porém os dados que corroborem essa afirmativa são escassos, o que motivou o estudo da microbiota intestinal na população amazonense. **Objetivos:** Avaliar o perfil da microbiota intestinal, estado nutricional, imunológico e perfil inflamatório, antes e após a cirurgia de remoção total ou parcial de estômago (gastrectomia) por câncer gástrico em pacientes que usaram suplementos probióticos. **Materiais e métodos:** Trata-se de um estudo clínico randomizado controlado, prospectivo, composto de cinco grupos – G1, G2, G3, G4 e G5, em que se avaliou o uso de probióticos, tanto na modulação da resposta imune quanto no perfil da microbiota intestinal e na redução de complicações cirúrgicas. **Resultados:** Foram avaliados, no primeiro tempo do estudo, no período de dezembro de 2020 a maio de 2022, 24 pacientes, com média de idade de $58,8 \pm 14,4$ anos (intervalo de 24 a 81 anos), cuja maioria era do sexo masculino (70,8%) e com adenocarcinoma (83,3%). Avaliaram-se suas variáveis clínicas, tais como circunferência muscular do braço ($P=0,006$), ângulo de fase ($P= <0,001$), espessura do músculo adutor do polegar ($P=0,005$) e especialmente calprotectina fecal ($P=<0,001$). Quanto às citocinas inflamatórias, demonstrou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos probiótico e não probiótico, porém o grupo com uso de probiótico parece ter respondido bem a algumas citocinas (CXCL-8, TNF- α , IL-17a, IL-4) (p -valor $>0,05$), das quais a IL-17a foi a que mais se mostrou estatisticamente significativa (p -valor $<0,001$). Dados da microbiota intestinal demonstraram que um filo foi digno de nota, o *Proteobacteria*, com 10,4%, o que demonstra um padrão de disbiose no grupo câncer. Sobre os gêneros, o de maior abundância foi o *Streptococcus* (p -valor 0,019); quando se observam as comparações entre microbiota e citocinas, *Alloprevotella* (p -valor 0,004) e *Christensenellaceae_R-7_group* (p -valor 0,01) foram diferencialmente abundantes, porém reduzidas no contexto de muitas complicações, das quais *Alloprevotella* é um biomarcador para câncer gástrico. No segundo tempo do estudo, foram avaliados 52 pacientes ao total, cujas complicações mais comuns foram náuseas e vômitos ($N=39$, 75%). Houve um maior percentual entre os que foram classificados com muitas complicações (60%) no grupo probiótico (+), o que mostra, portanto, que não houve interferência positiva na redução de complicações ao usar sete dias de probióticos conforme o protocolo deste estudo. **Conclusão:** É possível inferir que o câncer tem um papel importante na manutenção da disbiose intestinal e que um tempo maior de uso de probióticos deve ser considerado para que haja modulação intestinal da microbiota e do perfil inflamatório nos pacientes com câncer gástrico.

Palavras-chave: Neoplasias gástricas; câncer; microbioma gastrointestinal; estado nutricional; fatores imunológicos.

ABSTRACT

Introduction: Gastric cancer (GC) is the fifth most common neoplasm in the world, with more than 1 million new cases per year. The most accepted etiology is based on the influence of tissue mutation promoted by a bacterium from the gastric commensal microbiota called *H. pylori*. The gold standard treatment for gastric cancer is surgery to remove all or part of the stomach. Surgery has great power to modify the human microbiota, whose changes are still poorly understood in Amazonas. Several factors can also contribute to changes in the intestinal microbiota in patients with gastric cancer, which can culminate in both the worsening of clinical outcomes and the modification of the intestinal microbiota profile, combined with the impairment of the immunological response pattern, however data corroborating This statement is scarce, which motivated the study of the intestinal microbiota in the Amazonian population.

Objectives: To evaluate the intestinal microbiota profile, nutritional, immunological status and inflammatory profile, before and after surgery to remove total or partial stomach (gastrectomy) for gastric cancer in patients who used probiotic supplements.

Materials and methods: This is a randomized controlled, prospective clinical study, composed of five groups – G1, G2, G3, G4 and G5, where we evaluated the use of probiotics, both in modulating the immune response and in the intestinal microbiota profile and reducing surgical complications. **Results:** In the first period of the study, from December 2020 to May 2022, 24 patients were evaluated, with a mean age of 58.8 ± 14.4 years (range 24 to 81 years), the majority of whom were male (70.8%) and with adenocarcinoma (83.3%). Regarding clinical variables, such as arm muscle circumference ($P=0.006$), phase angle ($P= <0.001$), adductor pollicis muscle thickness ($P=0.005$) and especially fecal calprotectin ($P=<0.001$). Regarding inflammatory cytokines, it was demonstrated that there were no statistically significant differences when comparing the probiotic and non-probiotic groups, however the group using probiotics seems to have responded well to some cytokines (CXCL-8, TNF- α , IL-17a, IL-4) (p -value >0.05), of which IL-17a was the cytokine that was most statistically significant (p -value <0.001). Data from the intestinal microbiota demonstrated that one phylum was noteworthy, Proteobacteria, with 10.4%, which demonstrates a pattern of dysbiosis in the cancer group. Regarding the genera, the one with the greatest abundance was *Streptococcus* (p -value 0.019); when comparing comparisons between microbiota and cytokines, *Alloprevotella* (p -value 0.004) and *Christensenellaceae_R-7_group* (p -value 0.01) were differentially abundant, but reduced in the context of many complications, with *Alloprevotella* being a biomarker for gastric cancer. In the second phase of the study, a total of 52 patients were evaluated, whose most common complication was nausea and vomiting ($N=39$, 75%). There was a higher percentage of those classified as having many complications (60%) in the probiotic (+) group, which therefore shows that there was no positive interference in reducing complications when using seven days of probiotics according to the protocol of this study. **Conclusion:** It is possible to infer that cancer plays an important role in maintaining intestinal dysbiosis and that a longer period of probiotic use should be considered so that there is intestinal modulation of the microbiota and the inflammatory profile in patients with gastric cancer.

Keywords: Gastric neoplasms; cancer; gastrointestinal microbiome; nutritional status; immunological factors.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador do universo, nosso Deus e causa primeira de todas as coisas. Ele que tudo excede ao nosso entendimento; é por Ele que estamos, somos, morremos e evoluímos.

Ao Rafael Torres, que suportou meus dias de ausência e foi resiliente às intempéries das angústias de um doutorando.

Aos meus ilustres pais, Rui e Aldeth Paz, que, mesmo sem saber, contribuíram muito para meus voos mais altos. AMO VOCÊS!

Aos meus pacientes, que se doaram para o sucesso deste estudo.

Aos meus alunos de iniciação científica, Thalita, Glória, Max, Agnes, Anita Rachel, Rebeca, Ísis – a vocês o meu muito obrigado, pois sem vocês não teríamos como prosseguir; espero que eu tenha incutido no coração de vocês o amor ao cuidado e à pesquisa científica.

À amiga muito querida Samara Martins, que deu seu apoio moral ao longo desta caminhada.

As amigas de trabalho da FCECON Barbara Abraham, Gilmara Braga, Francielma, que muito me apoiaram nesse período; muitas vezes cobrindo minha ausência no setor de nutrição.

Ao Biomédico Jhonnatan Souza, por todo o seu apoio nas coletas de dados e pelos ajustes com os bolsistas, o meu muito obrigado.

Aos amigos da FHEMOAM, o Dr. Allyson Costa, e o biomédico Claudio Lucas, pelo seu apoio científico e técnico. Gratidão a vocês!

Aos amigos da DEP, que sempre estiveram comigo dando o suporte científico necessário para minha evolução como iniciante da pesquisa clínica.

À minha amiga Dra. Valquíria Martins por toda a sua dedicação e paciência ao me mostrar o caminho da escrita científica.

Ao meu ilustre orientador, Prof. Dr. José Fernando Barcellos, que sempre foi meu incentivador, com seu alto astral.

Aos amigos da Oncologia Sensumed e do ISENP, Dr. Fuzita, Dra. Lia, Dra. Fernanda, Enf. Ana Karla, Enf. Dani por todo o apoio científico-financeiro e até emocional às vezes. A vocês a minha eterna gratidão.

À FCECON, na pessoa do Dr. Gerson Mourão, que, mesmo que de forma indireta, deu seu apoio a esta pesquisa.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha amiga de outras vidas – a minha eterna avó, Francisca Pereira de Souza (*in memoriam*), que, durante os anos de convívio, me ensinou a encarar os desafios da vida com mente aberta, força e garra.
Vó, mesmo sabendo de tudo, você faz falta.
Te amo!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diversidade da microbiota humana em diferentes escalas filogenéticas	21
Figura 2 – Funções da microbiota intestinal normal.....	22
Figura 3 – Eventos perioperatórios na microbiota intestinal.....	24
Figura 4 – Câncer gástrico induzido por <i>H. pylori</i>	29
Figura 5 – Cladograma do perfil filogenético de pacientes em tratamento do câncer.....	37
Figura 6 – Regiões variáveis do RNA ribossomal 16s.....	41
Figura 7 – Diferentes métodos para avaliar a microbiota intestinal.....	42
Figura 8 – Delineamento experimental nutricional por protocolo convencional (PC) e grupo intervenção segundo fluxograma CONSORT (Eldridge <i>et al.</i> , 2016).....	63
Figura 9 – Delineamento experimental para teste de intervenção <i>versus</i> placebo na redução de complicações cirúrgicas no pós-operatório segundo fluxograma CONSORT (Eldridge <i>et al.</i> , 2016).....	64
Figura 10 – Grupos de estudo conforme resposta por objetivo específico.....	66
Figura 11 – Fluxograma de etapas da pesquisa.....	70
Figura 12 – Dispositivo coletor ColOff®.....	77
Figura 13 – Avaliação das complicações cirúrgicas entre os grupos probiótico (+) G4 e probiótico (-) G5.....	94
Figura 14 – Concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias entre os grupos controle e de pacientes sem e com intervenção com probióticos no pré-operatório.....	97
Figura 15 – Concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias entre os grupos controle e de pacientes sem e com intervenção com probióticos no pós-operatório.....	99
Figura 16 – Rede de interação entre as moléculas imunológicas entre os grupos controle e de pacientes sem e com intervenção com probióticos no pré e pós-operatório.....	100
Figura 17 – Curva de saturação das 36 amostras sequenciadas.....	101
Figura 18 – Diversidade alfa da microbiota bacteriana recuperada de amostras fecais no pré e pós-gastrectomia por câncer no Amazonas. Diversidade alfa: teste T para os índices Observed e teste não paramétrico de Mann-Whitney para os índices de Shannon.	103
Figura 19 – Diversidade beta da microbiota bacteriana recuperada de amostras fecais no pré e pós-gastrectomias por câncer no Amazonas. A) em relação ao grau de complicações Clavien-Dindo (p-valor 0,528); B) em relação ao ângulo de fase (AF°) (p-valor 0,363); C) em relação às diferenças entre os grupos controle e câncer. Diversidade beta: R: coeficiente de dissimilaridade ADONIS/PERMANOVA.....	108
Figura 20 – Boxplot da abundância relativa dos filos de grupos câncer e controle.....	111
Figura 21 – Análise comparativa de bactérias diferencialmente abundantes nos grupos controle e câncer (no pré e pós-operatório), onde: A) Média da abundância relativa de Anaerofilum (p-valor 0,038); B) Média da abundância relativa de Anaerostipe (p-valor 0,046); C) Média da abundância relativa de Monoglobus (p-valor 0,044); D) Média da abundância relativa de Nocardia (p-valor 0,008); E) Média da abundância relativa de RF-39 (p-valor 0,035); F) Média da abundância relativa de Tepidibacter (p-valor 0,026). Realizado teste para variáveis não paramétricas de Kruskal-Wallis.	118
Figura 22 – Média da abundância relativa de <i>Streptococcus</i> (p-valor 0,0019).....	120
Figura 23 – Média da abundância relativa de <i>Veillonella</i> (p-valor 0,0019).....	122

Figura 24 – Gêneros bacterianos da microbiota intestinal dos pacientes que apresentaram correlação significativa com a variação das citocinas nos pacientes (valor $p < 0,05$), onde: **A)** Heatmap de correlações significativas entre bactérias e citocinas no grupo probiótico (-); **B)** Heatmap de correlações significativas entre bactérias e citocinas no grupo probiótico (+). Teste da análise: correlação de Spearman. 123

Quadro 1 – Métodos de modulação da microbiota 46

Quadro 2 – Significado da perda de peso em relação ao tempo 73

Quadro 3 – Classificação do estado nutricional de acordo com adequação do peso 73

Quadro 4 – Percentis de circunferência do braço (cm) para ambos os gêneros 74

Quadro 5 – Estado nutricional segundo a circunferência do braço 75

Quadro 6 – Classificação das complicações cirúrgicas de Clavien-Dindo (CCD-BR) 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Adequação da CMB para classificação do estado nutricional	76
Tabela 2 – Características sociodemográficas e cirúrgicas de pacientes de todos os grupos do estudo, na FCECON	87
Tabela 3 – Características clínicas de pacientes submetidos a procedimento cirúrgico na FCECON, segundo grupos de probióticos (+) e probióticos (-) (N=24), nos momentos p	89
Tabela 4 – Comparação de variáveis antropométricas e bioquímicas, entre grupos pré e pós-cirurgia e comportamento dos grupos ao longo do tempo de pacientes submetidos a procedimento cirúrgico no setor de cirurgia da FCECON, segundo grupos probiótico (+) e probiótico (-) (N=24)	91
Tabela 5 – Análise comparativa da microbiota intestinal dos pacientes estratificados classificados em pré-operatório (n = 11*), pós-operatório (n = 12) e controle saudável (n = 12) de acordo com a condição clínica de cada grupo por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Média da abundância relativa das sequências bacterianas (x10.000) seguida de desvio padrão entre parênteses (P valor < 0.05)	115
Tabela 6 – Análise comparativa da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em (probiótico (+) (n=12) e (probiótico (-) (n=12) por meio de teste não paramétrico de Wilcoxon. Média da abundância relativa das sequências bacterianas (x10.000) seguida de desvio padrão entre parênteses (P valor < 0.05)	120
Tabela 7 – Análise comparativa da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em MC (pacientes com muitas complicações) e PC (pacientes com poucas complicações) conforme a classificação de complicações cirúrgicas de Clavien-Dindo por meio de teste não paramétrico de Wilcoxon. Média da abundância relativa das sequências bacterianas (x10.000) seguida de desvio padrão entre parênteses (P valor < 0.05)	127

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AM	Estado do Amazonas
AGCC	Acido graxo de cadeia curta
AMB	Área muscular do braço
AP-1	Proteína ativadora 1
AVC-i	Acidente vascular cerebral isquêmico
BAL	Bactérias do ácido láctico
BIA	Bioimpedância elétrica
CaGA	Proteína do gene A associada a citotoxina
CB	Circunferência do braço
CCD-BR	Classificação de Clavien-Dindo-Brasil
CD-4	<i>Cluster of differentiation-4</i>
CD-8	<i>Cluster of differentiation-8</i>
CD-25	<i>Cluster of differentiation-25</i>
CD-80	<i>Cluster of differentiation-80</i>
CD-86	<i>Cluster of differentiation-86</i>
CMB	Circunferência muscular do braço
CLTP	Contagem total de linfócitos periféricos
CG	Câncer gástrico
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DCT	Dobra cutânea tricipital
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Difenil-B-picrilhidrazil
ECR	Ensaio Clínico Randomizado
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMAP	Espessura do músculo adutor do polegar
EUA	Estados Unidos da América
ERK	Quinase Regulada por Sinal extracelular
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

GI	Gastrointestinal
GRD	Gastrectomia radical distal
HMGB-1	High mobility group Box-1
HMP	Projeto microbioma humano
HT-NGS	Alto rendimento – sequenciamento de nova geração
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IRF-3	Fator regulador de interferon 3
IBP	Inibidor de bomba de prótons
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INF- γ	Interferon gama
LAG-3	Gene de ativação de linfócitos 3
LTDA	Limitada
MAMPs	Padrões moleculares associados a microrganismos
MAPK	Quinase Ativada por mitógeno
MCP	Marca-passo
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MyD88	Myeloid differentiation protein 88
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NGS	Sequenciamento de nova geração
NLRs	NOD-like receptors
NOD	Domínio de oligomerização de nucleotídeos
OIPA	Proteína Inflamatória A
OTU	Unidades taxonômicas operacionais
PAMPs	Padrão molecular associado a patógenos
PBM	Preparo Mecânico de Colón
PEG	PolietilenoGlicol
RAS	Sarcoma de Ratos
PCR	Proteína C reativa
PD-1	Proteína de morte celular programada 1

PD-L1	Ligante de proteína de morte celular programada 1
PD-L2	Ligante de proteína de morte celular programada 2
pH	Potencial de hidrogênio
PRÉ-OP	Pré-operatório
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PVs	Partículas virais
QFA	Questionário de frequência alimentar
rDNA	DNA ribossomal
rRNA	RNA ribossomal
SES-AM	Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema nervoso central
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGI	Trato gastrointestinal
TLRs	Toll like receptors
TILs	Linfócito infiltrante de tumores
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TIM-3	T-cell immunoglobulin mucin-3
TNM	Sistema Internacional de Classificação dos Tumores
Tregs	Células T reguladoras
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRIS HCl	TRIS hydrochloride
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UTI	Unidade de terapia intensiva
VaCA	Proteína da Citotóxina A-Vacuolizante
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Câncer gástrico	19
1.2 A microbiota intestinal normal	21
1.3 Impacto da gastrectomia na microbiota intestinal.....	23
1.4 Estado inflamatório na resposta tumoral	24
2 REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 A epidemiologia do câncer gástrico.....	26
2.2 Etiologia	26
2.2.1 Microbiota na gênese do câncer gástrico	27
2.2.2 Uso de probióticos em cirurgias gastrointestinais.....	30
2.2.2.1 Aplicação de probióticos na disbiose em cirurgia digestiva	31
2.2.3 Microbiota induzindo tumorigênese e resposta imune	32
2.2.4 Resposta imune ao câncer.....	33
2.3 Tratamento cirúrgico do câncer gástrico	35
2.4 A microbiota intestinal modificando o contexto cirúrgico no câncer gástrico.....	36
2.4.1 Mudanças na barreira intestinal e seu impacto na composição da microbiota intestinal.....	37
2.5 O sequenciamento da microbiota intestinal.....	39
2.5.1 Diferentes estratégias de sequenciamento e bioinformática para análise do microbioma humano.....	41
2.6 Estratégias de identificação de DNA em amostras fecais.....	43
2.7 Modulação intestinal e seus possíveis efeitos: o que sabemos?	44
2.7.1 Transplante de microbiota fecal	44
2.7.2 Uso de probióticos	45
2.7.3 Dieta	45
2.8 Impacto do câncer no estado nutricional	47
2.9 O papel das citocinas inflamatórias.....	48
2.9.1 Fator de necrose tumoral (TNF)	49
2.9.2 Interleucina 6 (IL-6)	49
2.9.3 Interleucina 1 e seu receptor solúvel.....	49
2.9.4 Interferon gama (INF- γ)	50

2.9.5 Interleucina 10-IL 10.....	51
2.9.6 Quimiocinas e sua CXCL-8	51
2.9.7 Interleucina-12-IL-12	52
2.9.8 Interleucina 2, IL-2	53
2.9.9 Interleucina 17a-IL-17a	53
2.9.10 Interleucina 4-IL-4	54
2.9.11 Citocinas inflamatórias e o câncer gástrico	55
2.10 O papel da calprotectina na avaliação da inflamação intestinal.....	56
3 JUSTIFICATIVA	57
4 OBJETIVOS	58
4.1 Geral	58
4.2 Objetivos específicos	58
5 MATERIAL E MÉTODOS	59
5.1 Tipo de estudo	59
5.2 População do estudo	59
5.3 Cálculo amostral	60
5.4 Local da coleta de dados	61
5.5 Critério de inclusão para os grupos G1, G2, G4 e G5	61
5.6 Critério de exclusão para os grupos G1, G2, G4 e G5	62
5.7 Critério de inclusão para o grupo G3 (controle negativo-saudável)	62
5.8 Critério de exclusão para o grupo G3 (controle negativo-saudável)	63
5.9 Fluxograma de recrutamento – primeiro tempo do estudo	63
5.9.1 Fluxograma de recrutamento – segundo tempo do estudo (desfechos clínicos)	64
5.10 Fases operacionais da pesquisa	65
5.10.1 Recrutamento e randomização	65
5.10.2 Estágios operacionais da pesquisa – grupo intervenção G1	66
5.10.3 Estágios operacionais da pesquisa – grupo controle G2	67
5.10.4 Estágios operacionais da pesquisa – grupo controle negativo G3.....	68
5.10.5 Estágios operacionais da pesquisa – grupo desfechos clínicos G4 e G5	68
5.10.6 Protocolo de teste	69
5.10.7 Variáveis de avaliação clínica e do estado nutricional	71
5.11 Análise inflamatória.....	76
5.12 Avaliação das citocinas CXCL-8, IL-1B, IL-6, TNF-A, IL-12P70, IL-2, INF-Y, IL-17A, IL-4, IL-10	76

5.13 Sequenciamento metagenômico do gene 16s rRNA	77
5.13.1 Métodos para o grupo 1 – probiótico (+) e grupo 2 – probiótico (-)	77
5.13.1.1 Coleta de fezes	77
5.13.1.2 Extração e purificação de DNA e RNA fecal.....	78
5.13.2 Avaliação qualitativa e quantitativa do DNA	78
5.13.2.1 Investigação de bactérias da microbiota por avaliação do gene 16s do RNA	79
5.13.2.1.1 Amplificação do gene-alvo (16s rRNA) e sequenciamento	79
5.13.2.1.2 Processamento e filtragem das amostras sequenciadas	80
5.14 Calprotectina	81
5.15 Avaliação das complicações do tratamento cirúrgico	81
6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	83
7 ASPECTOS ÉTICOS	84
8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
9 APOIO CIENTÍFICO	86
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
10.1 Dados clínicos dos participantes	87
10.2 Dados do estado clínico-nutricional.....	88
10.3 Dados da avaliação das complicações cirúrgicas.....	93
10.4 Dados da avaliação de mediadores solúveis da inflamação.....	95
10.5 Dados da microbiota intestinal	100
10.5.1 Resultado do processamento das <i>reads</i>	100
10.5.2 Diversidades alfa e beta	101
10.5.3 Filos	111
10.5.4 <i>Firmicutes</i>	112
10.5.5 <i>Bacteroidetes</i>	113
10.5.6 <i>Proteobacteria</i>	113
10.5.7 Bactérias diferencialmente abundantes.....	114
10.5.8 Bactérias diferencialmente abundantes <i>versus</i> citocinas inflamatórias.....	122
10.5.9 Bactérias diferencialmente abundantes em pacientes com muitas complicações	127
10.6 Conclusão	130
11 ORÇAMENTO	131
12 FONTE DE FINANCIAMENTO	132
13 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	133

14 EQUIPE DO PROJETO	136
15 REFERÊNCIAS	137
ANEXO 1 – COMPROVANTES ÉTICOS	159
ANEXO 2 – REGISTRO DE ECR.....	161
ANEXO 3 – REGISTRO REBEC.....	162
ANEXO 4 – PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS – SUBMISSÕES	163
ANEXO 5 – PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS – CARTA DE ACEITE.....	164
APÊNDICE A – DECLARAÇÃO SOBRE O USO E DESTINAÇÃO DO MATERIAL E/OU DADOS COLETADOS.....	166
APÊNDICE B – DECLARAÇÃO DE QUE OS RESULTADOS DA PESQUISA SERÃO TORNADOS PÚBLICOS, SEJAM FAVORÁVEIS OU NÃO.....	167
APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO	168
APÊNDICE D – RECORDATÓRIO ALIMENTAR - 24H	169
APÊNDICE E – INSTRUMENTO PARA COLETA DE ANTROPOMETRIA.....	170
APÊNDICE F – INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	171
APÊNDICE G – BIOIMPEDÂNCIA – BIODYNAMICS 450	172
PROTOCOLO PARA TESTE DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA.....	172
APÊNDICE H – FICHA DE COLETA DE DADOS AVALIAÇÃO CIRÚRGICA (COMPLICAÇÕES-PÓS-OP).....	173
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G1 E G2	174
APÊNDICE J – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G3.....	177
APÊNDICE K – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G4/G5	180
APÊNDICE L – PROTOCOLO DE QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS PELO MÉTODO CBA.....	183

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer gástrico

O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia mais frequente no mundo, com mais de 1 milhão de novos casos por ano, o que contribui para que seja a terceira maior causa de morte pela doença, com aproximadamente 783 mil mortes anuais (Bray *et al.*, 2018; Clinton *et al.*, 2020). A distribuição do CG varia de forma significativa ao redor do globo, de modo que a Ásia representa 73%; a Europa, 15%; e as Américas Central e do Sul, 7% dos casos mundiais (Carcas, 2014). Entre os homens, é o mais incidente e mortal em alguns países da Ásia Ocidental, tais como Irã, Turcomenistão e Quirguistão. Também na Ásia Oriental, destacam-se, com elevados índices da doença países como Japão, Mongólia e Coreia do Sul, sendo o último o país com as mais altas taxas dessa neoplasia, em ambos os sexos (INCA, 2023).

O número estimado de casos novos de câncer gástrico para o Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 21.480 casos, o que corresponde ao risco estimado de 9,94 casos por 100 mil habitantes, sendo 13.340 casos em homens e 8.140 casos em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 12,63 casos novos a cada 100 mil homens; e 7,36 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

Em termos de mortalidade no Brasil, em 2020, ocorreram 13.850 óbitos por CG, correspondendo a 6,54 mortes a cada 100 mil brasileiros. Entre os homens, foram 8.772 óbitos, equivalendo a 8,47 mortes a cada 100 mil homens. Já entre as mulheres, aconteceram 5.078 óbitos, o equivalente a 4,69 mortes a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023); no Amazonas, o câncer gástrico é um dos tipos com maior incidência (FCECON, 2022).

O CG é uma doença de causa multifatorial, que resulta da combinação de fatores exógenos como dieta, consumo de álcool, tabagismo, infecção por microrganismos específicos, bem como também está associado a fatores endógenos, como o acúmulo de alterações genéticas (Besagio *et al.*, 2021; Rawla; Barsouk, 2019). A transformação maligna das células gástricas advém da interação de vários desses fatores ao longo de muitos anos (Besagio *et al.*, 2021).

Os sinais e sintomas do câncer gástrico são inespecíficos e geralmente incluem hiporexia, perda ponderal, dor abdominal, sensação de plenitude gástrica após a

alimentação, indigestão, náuseas, vômito com ou sem hemorragias e anemia (Campelo; Lima, 2012; Muraro, 2003; Shivappa; Steck; *et al.*, 2014). O câncer gástrico em estágio inicial raramente causa sintomas. Essa é uma das razões pelas quais o diagnóstico desse tipo de neoplasia é difícil nos estágios iniciais da doença. Mesmo nos EUA, quatro em cada cinco pacientes apresentam doença metastática na ocasião do diagnóstico do câncer gástrico (American Cancer Society, 2021; Rawla; Barsouk, 2019).

A abordagem cirúrgica, incluindo gastrectomia proximal, distal e total com dissecação prolongada de linfonodos, é o principal tratamento curativo para CG até o momento, sendo considerado padrão ouro. A gastrectomia radical distal (GRD), um tratamento cirúrgico padrão para o terço médio ou inferior do CG, foi identificada como tendo melhores resultados em comparação com a gastrectomia total (Liu, Zhen *et al.*, 2017).

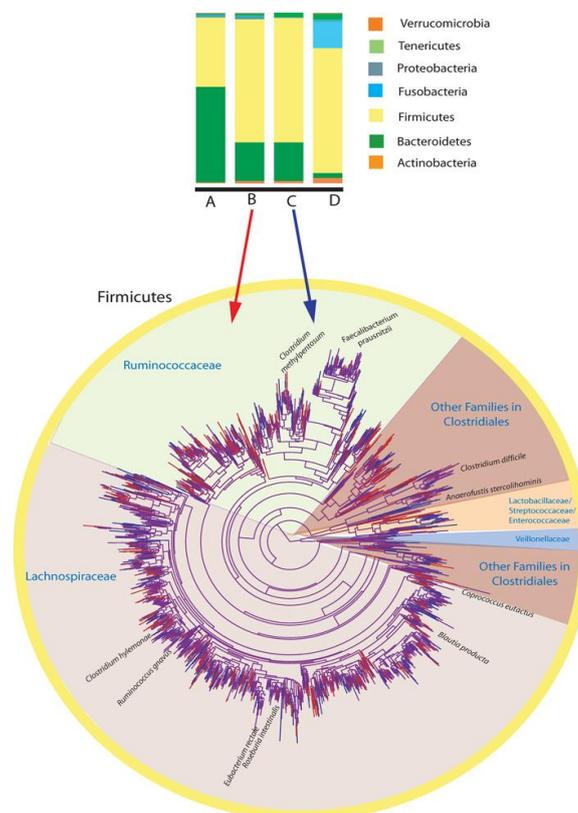
Durante muitos anos, perpetuou-se o dogma de que o estômago seria um órgão estéril, justificado pela alta acidez do suco gástrico. No entanto foi identificado que a proteobactéria *Helicobacter pylori*, um bacilo gram-negativo que causa uma inflamação persistente e crônica na mucosa gástrica, pode levar ao desenvolvimento da metaplasia, condição que, quando não tratada, possui grande potencial para evoluir ao longo do tempo para displasia e posteriormente para um adenocarcinoma (Galmiche; Rassow, 2010; Moyat; Velin, 2014). A malignização do tecido gástrico causado por *H. pylori* é mais comumente associada ao subtipo intestinal do adenocarcinoma gástrico (Khatoon; Rai; Prasad, 2016).

Em longo prazo essas alterações podem predispor à disbiose – um desequilíbrio da comunidade microbiana que pode mudar o equilíbrio entre bactérias comensais patogênicas (Moyat; Velin, 2014). 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 para corroborar tal tese, 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 que esse risco é maior da interação entre os microrganismos, considerando-se também fatores exógenos como a dieta (Lozupone *et al.*, 2012).

1.2 A microbiota intestinal normal

Com mais de 1 trilhão de bactérias, a microbiota gastrointestinal representa 70% de toda a população de microrganismos comensais no corpo do ser humano. A microbiota humana é o conjunto de microrganismos – bactérias, fungos, vírus e protozoários – que habitam diversos órgãos do corpo e biofluidos, que incluem a pele, o trato respiratório, a mucosa oral, o trato gastrointestinal, entre outros (Francescone; Hou; Grivennikov, 2014a; Yachida *et al.*, 2019). Ela representa um ecossistema que possui uma intercomunicação constante com o hospedeiro, influenciando os estados de saúde e doença (Nardone; Compare, 2015). Em humanos adultos, filos como *Bacteroidetes* e *Firmicutes* geralmente dominam a microbiota, enquanto *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*, embora encontrados em muitas pessoas, são geralmente constituintes menores (Lozupone *et al.*, 2012) (**Figura 1**).

Figura 1 – Diversidade da microbiota humana em diferentes escalas filogenéticas

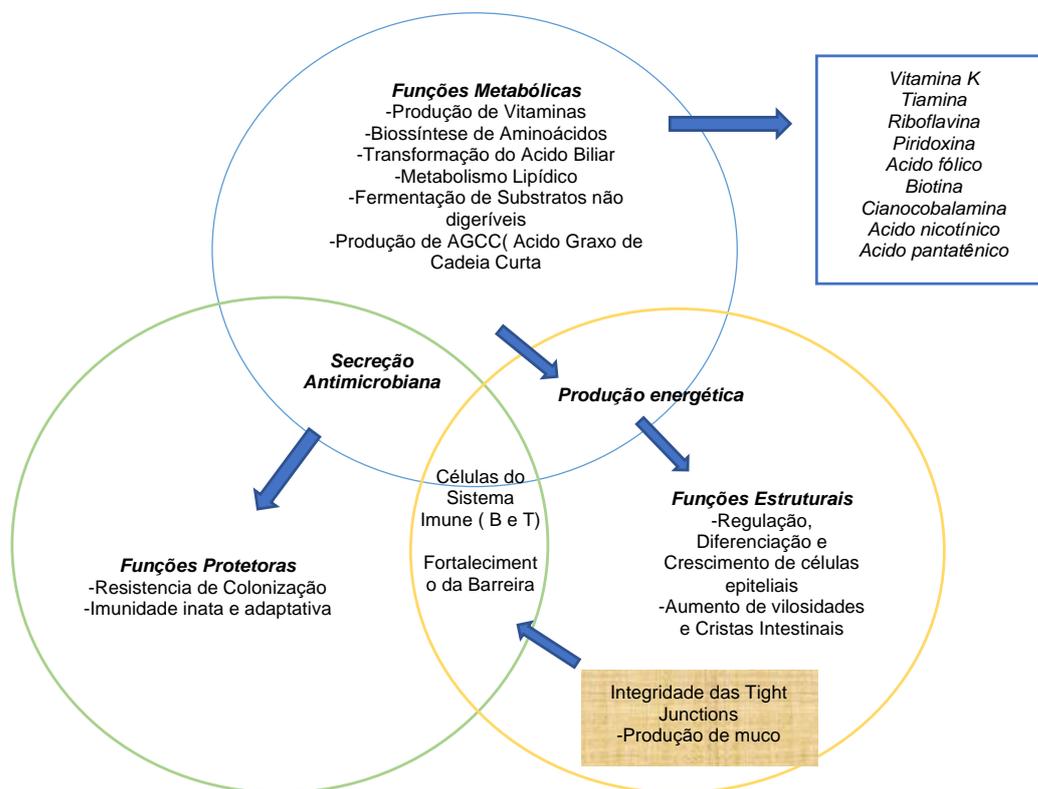


Fonte: Adaptado de Lozupone *et al.* (2012).

Nota: A= indivíduo com proporção alta de *Bacteroidetes*, B e C= indivíduos com domínio de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, D= indivíduo com alta proporção do filo *Fusobacteria*.

O microbioma é o genoma agregado de toda a microbiota e é da ordem de 250 a 800 vezes maior que o genoma humano (Schwabe; Jobin, 2013). Ele contribui para o metagenoma, somatório de todos os genomas presentes no organismo, com genes cruciais para a saúde, presentes na metabolização de produtos alimentares, na síntese de nutrientes, vitaminas e fatores tróficos (Pascale *et al.*, 2018), na maturação do sistema nervoso (Fung; Olson; Hsiao, 2017), na maturação e modulação do sistema imunológico (Palm; De Zoete; Flavell, 2015), bem como na proteção direta contra agentes patogênicos (Abbas, Abul, 2012) (**Figura 2**).

Figura 2 – Funções da microbiota intestinal normal



Fonte: Adaptado de Pascale *et al.*, 2018.

O estudo da composição da microbiota é possível por meio das técnicas de metagenômica, um conjunto de métodos baseados no sequenciamento e na análise bioinformática de ácidos nucleicos, o que permite detectar, em larga-escala e de modo independente de cultivo, uma determinada microbiota (Pareek; Smoczynski; Tretyn, 2011). Assim, a metagenômica é caracterizada por meio dos sequenciamentos genômicos em larga escala de microbiomas complexos. O sequenciamento do gene

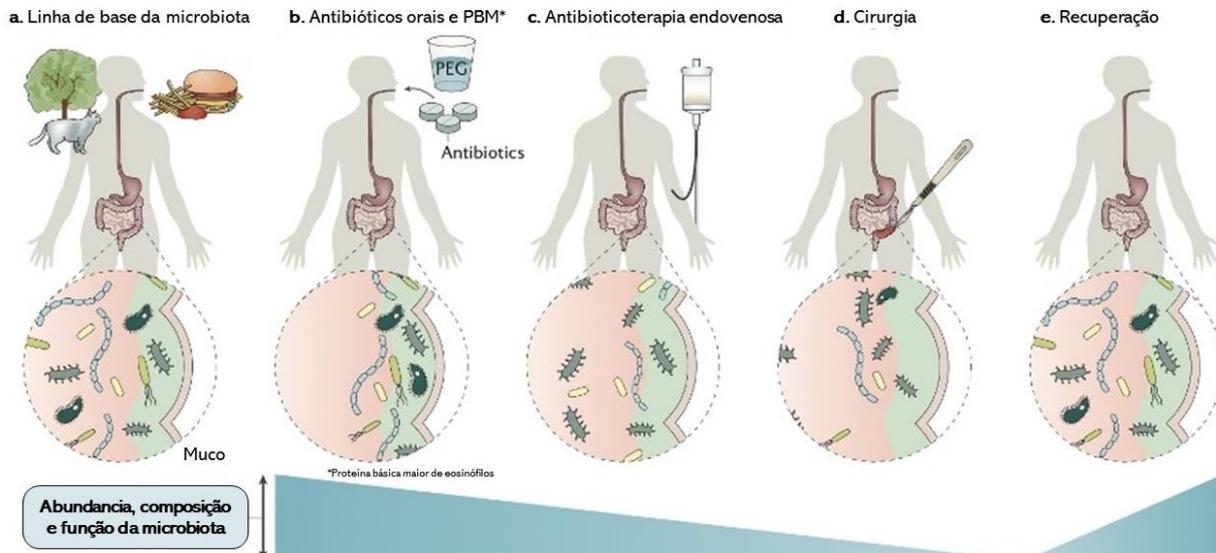
codificador da subunidade 16s do RNA ribossomal bacteriano (rRNA) é um dos métodos mais utilizados na avaliação das bactérias presentes na amostra (Almonacid *et al.*, 2019) (**Figura 2**). A região 16s desse gene contém regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis do DNA, que sofreram diferentes pressões evolutivas e conseqüentemente acumularam diferentes taxas de mutação (Almonacid *et al.*, 2019).

1.3 Impacto da gastrectomia na microbiota intestinal

As evidências crescentes dos estudos clínicos mostraram grandes mudanças na microbiota intestinal humana após as cirurgias oncológicas gastrointestinais (Gaines *et al.*, 2018; Rogers *et al.*, 2017a). Essas mudanças não eram descritas de forma homogênea entre as todas as publicações científicas por apenas avaliarem cirurgias intestinais. Estudos baseados na análise da sequência do gene 16s rRNA em amostras de fezes revelaram enriquecimento e esgotamento de certos táxons bacterianos após a cirurgia em pacientes com câncer colorretal (Gaines *et al.*, 2018; Ohigashi *et al.*, 2013).

No entanto as alterações da microbiota intestinal em pacientes com câncer gástrico no período perioperatório não são completamente compreendidas. A exposição clínica, que inclui antibióticos, patógenos alimentares e nosocomiais, pode influenciar a microbiota intestinal durante o período perioperatório (**Figura 3**). No caso de pacientes com câncer gástrico, operados, a microbiota intestinal pode ser ainda mais impactada pela reconstrução digestiva e pela redução da carga tumoral (Tseng *et al.*, 2016).

Figura 3 – Eventos perioperatórios na microbiota intestinal



Fonte: (Guyton; Alverdy, 2017)

Nota: a) Microbiota normal b) A limpeza purgativa elimina o conteúdo intestinal volumoso, e os antibióticos reduzem a carga bacteriana luminal. c) Antibióticos intravenosos (IV) exercem pressão seletiva adicional d) O estresse cirúrgico pode mudar os fenótipos bacterianos. e) A fase de recuperação saudável inclui refaunação de bactérias comensais, preparação mecânica do intestino.

1.4 Estado inflamatório na resposta tumoral

É bem conhecida a existência de um elo entre a má nutrição e a inflamação sistêmica no câncer. Entretanto os mecanismos e os efeitos dessa resposta inflamatória não são claros (Rydén *et al.*, 2008; Weimann *et al.*, 2017). Nos últimos anos, tem sido enfatizado o papel da inflamação no desenvolvimento e na progressão de diferentes tipos de tumores, induzida pela expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo tumor e/ou liberadas pelo sistema imunológico (Argilés *et al.*, 2009; Argilés; Busquets; López-Soriano, 2003; Bing; Trayhurn, 2008; Blum *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2018; Roxburgh; McMillan, 2014; Tan *et al.*, 2012).

As células do sistema imune (linfócitos e macrófagos) e do tecido estromal que constituem o microambiente tumoral produzem citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão (Balkwill, F.; Mantovani, 2001; Borsig *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2018; Kuper; Adami; Trichopoulos, 2000; Schwartsburd, 2003). As principais citocinas que influenciam na resposta de fase aguda são a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1

beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ) (Gulen *et al.*, 2012; O’Riordain *et al.*, 1999). Em pacientes com neoplasias, as citocinas apresentam um padrão funcional complexo, e a expressão de uma citocina pode ser induzida ou suprimida por outra (Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014), cujo efeito foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Nakazaki, 1992a). Por exemplo, o estímulo com TNF- α aumenta a produção de IL-1, que por sua vez estimula a produção de IL-6 (Carter *et al.*, 1990; Nakazaki, 1992b), o que faz com que essa desregulação muitas vezes favoreça o tumor.

Olhando intimamente o trato gastrointestinal, a associação entre a inflamação crônica e o desenvolvimento ou a progressão de alguma célula tumoral tem sido objeto de estudos ao longo dos últimos anos (Ferrone; Dranoff, 2010), pois existe uma sinergia entre as células tumorais gástricas e as células endoteliais do parênquima do órgão em termos de efeitos biológicos das citocinas no microambiente tumoral (Gong *et al.*, 2018).

Esse microambiente pode contribuir para a tumorigênese por meio da indução de instabilidade genômica, alterações epigenéticas e consequentemente expressão genética inadequada, levando à maior proliferação celular, à resistência a apoptose, à angiogênese e à disseminação de células tumorais (Gong *et al.*, 2018; Schwartsburd, 2003). O microambiente tumoral pode conferir resistência à resposta imune do hospedeiro e comprometer os efeitos de agentes quimioterápicos (Slaviero; Clarke; Rivory, 2003). A resposta inflamatória local pode ser ampliada para uma resposta sistêmica. A ativação excessiva ou prolongada de macrófagos e neutrófilos resulta em produção inadequada de citocinas (Gong *et al.*, 2018). Após sua ligação a receptores específicos, as citocinas produzidas pelo tecido tumoral sensibilizam as células mononucleares do sangue periférico do hospedeiro, induzindo a expressão de outras citocinas (Gong *et al.*, 2018), o que favorece assim a progressão tumoral, fortalece seu mecanismo de camuflagem e diminui a eficácia de drogas citotóxicas.

Desta feita, o conhecimento da relação sistema imune e seus fatores inflamatórios *versus* microbiota intestinal é de fundamental importância na compreensão do papel dos probióticos envolvidos tanto na resposta imunológica ao tumor, quanto na homeostase intestinal e sistêmica no pós-tratamento do câncer, haja vista a insipiência de dados relacionando a microbiota intestinal com o câncer gástrico e seus tratamentos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A epidemiologia do câncer gástrico

Em relação à taxa de incidência global, estima-se que haja cerca de 1 milhão de novos casos de câncer gástrico a cada ano (Machlowska *et al.*, 2020), que é o quarto tumor mais comum em homens, com cerca de 631.000 novos casos dentre as mulheres, é o quinto, com cerca de 320.000 novos casos. Ainda em escala mundial, a incidência da formação desse tumor é maior em homens do que em mulheres, na proporção de 2:1 (Mendes; Santana, 2019). Das 990.000 pessoas que são diagnosticadas com câncer gástrico no mundo, aproximadamente cerca de 738.000 morrem, sendo considerado o quarto tipo de câncer mais comum e a segunda causa de morte mais frequente por câncer (Machlowska *et al.*, 2020).

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico ocupa a quinta posição entre os tipos mais frequentes. As taxas de incidência mais elevadas são observadas na Região Sul, para ambos os sexos. Em homens, é o segundo mais frequente na Região Norte (12,55 por 100 mil). Na Região Nordeste (12,17 por 100 mil), ocupa o terceiro lugar. Nas Regiões Sul (15,02 por 100 mil) e Centro-oeste (10,20 por 100 mil), é o quarto mais frequente. Na Região Sudeste, é o quinto mais frequente (12,58 por 100 mil). Para as mulheres, é o quinto mais frequente nas Regiões Sul (8,41 por 100 mil) e Norte (6,53 por 100 mil). Nas Regiões Nordeste (7,46 por 100 mil) e Centro-oeste (6,68 por 100 mil), ocupa a sexta posição. Na Região Sudeste (7,25 por 100 mil), ocupa a oitava posição (INCA, 2023). Observa-se, principalmente, uma alta concentração de casos na Região Norte, em que, especificamente no Amazonas, é a segunda causa de morte em ambos os sexos (FCECON, 2022); e no Nordeste há uma incidência crescente em mulheres nascidas após 1960, além de uma maior mortalidade em cidades dessa região (Assumpção *et al.*, 2020).

2.2 Etiologia

O câncer gástrico é uma doença multifatorial resultante de fatores ambientais e genéticos. O consumo de alimentos conservados no sal e de defumados, a obesidade, o etilismo e o tabagismo têm sido apontados como fatores de risco para o

câncer gástrico (INCA, 2023). A inflamação crônica da mucosa gástrica induzida por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tem sido implicada na etiologia do câncer gástrico (Correa, 1988) por induzir atrofia gástrica e hipocloridria (Hold *et al.*, 2007). Embora essa infecção seja bem como na população humana mundial, apenas cerca de 1-2% dos indivíduos expostos progridem para o câncer gástrico (Scholte *et al.*, 2002). Assim, além dos fatores de virulência da bactéria, os padrões genéticos do hospedeiro, principalmente aqueles que regulam a resposta imunológica e inflamatória, também podem contribuir para uma progressão neoplásica (Melo Barbosa *et al.*, 2009). Polimorfismos genéticos em genes que codificam citocinas pró e anti-inflamatórias têm sido associados com um aumento na síntese dessas interleucinas e têm sido sugeridos como um fator determinante da hipocloridria relacionada à maior susceptibilidade ao câncer, bem como relatos científicos de indivíduos com sangue fator Rh A+ (El-Omar, 2001; Perez-Perez *et al.*, 2005).

A etnia e as variáveis geográficas, bem como fatores relacionados à biologia tumoral e ao ambiente, influenciam a incidência de câncer gástrico, em relação ao qual, embora seja um problema mundial, quase dois terços dos tumores do estômago ocorrem nos países em desenvolvimento, especialmente na América do Sul e na Ásia. Nesta última, para o sexo masculino, 466.900 casos foram relatados em regiões menos desenvolvidas economicamente em comparação com 173.700 casos em regiões mais desenvolvidas (Ang; Fock, 2014).

Vários fatores de risco são identificados como condicionantes para o câncer gástrico em múltiplas populações, conforme foi descrito anteriormente, mas o seu principal fator é a infecção pela bactéria *Helicobacter Pylori*. Existem ainda os fatores de risco hereditários, a exemplo do câncer hereditário difuso gástrico, o adenocarcinoma gástrico e a polipose proximal do estômago, mas se acredita que pessoas com estilo de vida saudável teriam menor risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (INCA, 2023).

2.2.1 Microbiota na gênese do câncer gástrico

A microbiota comensal gastrointestinal contempla inúmeras espécies bacterianas dos diversos filos como *proteobactérias*, que em sua maioria coabitam o lúmen gastrointestinal sem demais consequências ao hospedeiro. Na ocorrência de

fatores que desequilibrem esse ecossistema, bactérias patobiontes podem ocupar o lugar de bactérias benéficas, como é o caso da *H.pylori* (Moyat; Velin, 2014).

É importante compreender a relação da *H. pylori* com outras bactérias presentes no estômago. Durante a infecção, a microbiota gástrica é predominantemente constituída pelos filos das *proteobactérias*, seguidas por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobactérias* e, em menor proporção, por *fusobactérias* (Bruno *et al.*, 2019; Nardone; Compare, 2015). Muitas bactérias não sobrevivem ao pH ácido do estômago, porém em alguns indivíduos a infecção por *H.pylori* leva à hipocloridria. Dessa forma, a colonização e a neutralização do pH do ambiente gástrico em longo prazo podem contribuir diretamente para alterações na microbiota gástrica (Nardone; Compare, 2015; Schulz *et al.*, 2019).

Em longo prazo o uso de drogas inibidoras de bomba de prótons, frequentemente combinadas com antibioticoterapia durante a erradicação da *H. pylori*, (ou também frequentemente usadas em pacientes não infectados com ela, mas que possuem algum grau de alteração epitelial gástrica como a gastrite associada a sintomas como pirose), podem gerar um padrão de microbiota gástrica similar ao observado em pacientes com hipocloridria associada à gastrite atrófica (Malfertheiner; Kandulski; Venerito, 2017). Além do estômago, essas medicações têm sido amplamente associadas com perturbação da microbiota intestinal de modo que os pacientes que fazem seu uso podem apresentar menor diversidade total de microrganismos, maior predisposição à infecção por *Clostridium difficile*, diminuição de *Bacteroidetes* e maior abundância de *Firmicutes* (Bruno *et al.*, 2019; Imhann *et al.*, 2016; Malfertheiner; Kandulski; Venerito, 2017).

A *H. pylori* também promove indiretamente a carcinogênese por alterar a composição da microbiota gástrica. Na era dos estudos baseados em cultura, pensava-se que o estômago era estéril em pacientes saudáveis; no entanto, com os avanços no sequenciamento de DNA de genes de rRNA conservados, descobriu-se que o estômago abriga um ecossistema microbiano complexo, composto principalmente por bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobactéria*, *Bacteroides* e *Fusobacteria*, podendo ser fator de predisposição para disbiose intestinal, principalmente em pacientes de cirurgias gastrointestinais (Bik *et al.*, 2006; Dicksved *et al.*, 2009).

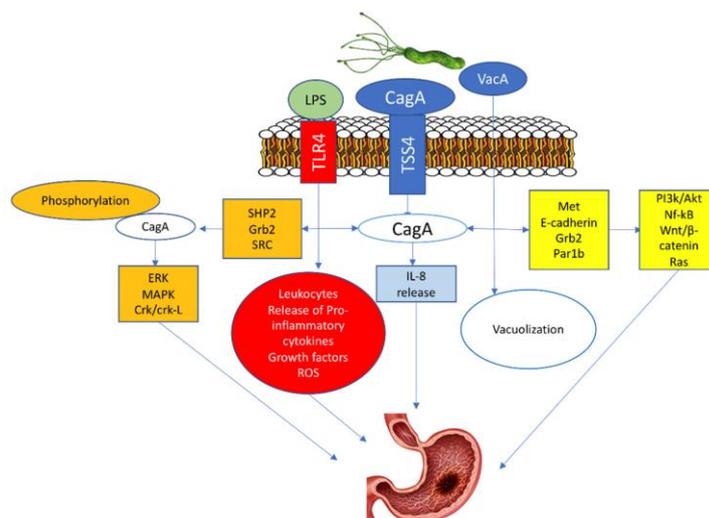
A infecção por *H. pylori* pode induzir mutação no DNA ao interromper quebras de fita dupla de DNA minimizando genes de reparo incompatíveis e metilação

aberrante do DNA e maximizando a expressão de citidina desaminase induzida por ativação (Ansari; Yamaoka, 2020; Maekita *et al.*, 2006).

Três moléculas são críticas para a potencial carga oncogênica de *H. pylori*: a proteína do gene A associado à citotoxina (CagA), a proteína da citotoxina A vacuolizante (VacA) e a proteína inflamatória externa A (OipA). O CagA penetra nas células epiteliais gástricas apenas quando o T4SS está ligado à integrina $\alpha 5\beta 1$. Posteriormente, o CagA translocado estimula a produção de IL-8 e provoca a desregulação da sinalização celular por meio de duas vias, uma dependente da fosforilação e uma independente da fosforilação. Na via fosforilada, a proteína CagA fosforilada com fosfatase 2 de homologia src (SHP2), juntamente com a proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (Grb2), ativam oncoproteínas, como quinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e CT10 (vírus do tumor de galinha n.º 10) regulador das vias de sinalização quinase (Crk) Crk/Crk-linker (Crk-L), que levam à proliferação celular irregular e ao desenvolvimento de GC (Pappas-Gogos *et al.*, 2022) (**Figura 4**).

Na via não fosforilada, o CagA ativa as vias NF- κ B, sarcoma de rato (RAS), integração sem asas-1 (Wnt)/ β -catenina64 e fosfatidilinositol 3-quinase/Akt interagindo com Met, E-caderina, Grb2 e as proteínas de sinalização 1b (Par1b) com defeito no particionamento da quinase reguladora da polaridade. Essas ativações causam alterações morfológicas nas células, proliferação irregular e câncer gástrico (Pappas-Gogos *et al.*, 2022).

Figura 4 – Câncer gástrico induzido por *H. pylori*



Fonte: Adaptado de (Pappas-Gogos *et al.*, 2022)

2.2.2 Uso de probióticos em cirurgias gastrointestinais

Desde a última década, pesquisadores investigam uma variedade de benefícios à saúde associados aos suplementos probióticos, que contêm principalmente microrganismos vivos das espécies *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. As principais áreas em que os pesquisadores se concentraram são o efeito dos suplementos de probióticos na microbiota intestinal, na prevenção do câncer, na eficácia e toxicidade da quimioterapia e na redução de complicações em cirurgias, dos quais este último é um dos objetos deste estudo (Ayyanna; Ankaiah; Arul, 2018).

Há evidências que implicam a microbiota intestinal nas complicações infecciosas após uma grande cirurgia digestiva (Arumugam; Lau; Chamberlain, 2016). É concebível que a manipulação da microbiota possa reduzir a incidência e/ou a magnitude das complicações cirúrgicas. Com base nesse conceito, além do uso geral de antibióticos, a administração perioperatória de vários probióticos (bactérias benéficas vivas) tem sido examinada em muitos ensaios clínicos (Sadahiro *et al.*, 2014).

Muitos microrganismos em suplementos probióticos são comumente encontrados em microrganismos intestinais humanos, como *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*. A maioria das bactérias probióticas no mercado hoje pertence apenas ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Jeppsson; Mangell; Thorlacius, 2011). Muitas cepas de bactérias do ácido lático (BAL) presentes nos probióticos fazem parte do microrganismo normal do corpo humano e desempenham papéis críticos na digestão dos alimentos e nas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (Ayyanna; Ankaiah; Arul, 2018).

A propriedade antioxidante das cepas BAL se deve à alta atividade de catalase e α -difenil- β -picrilhidrazil (DPPH) de eliminação de radicais livres. A ação anti-inflamatória é exibida pela ativação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), bem como pela diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6). As bactérias probióticas também podem inibir a síntese de prostaglandinas (Ayyanna; Ankaiah; Arul, 2018).

Recentemente, meta-análises relataram efeitos positivos do uso de simbióticos ou probióticos na prevenção de complicações infecciosas após cirurgia digestiva de grande porte (Arumugam; Lau; Chamberlain, 2016).

No entanto esses estudos são principalmente de centro único com populações amostrais relativamente pequenas. Além disso, há uma heterogeneidade substancial entre os ensaios derivados de disparidades clínicas: diferenças no tipo, dosagem e estratégias de administração (via, tempo e duração) dos probióticos, bem como nos procedimentos cirúrgicos. Assim, uma resposta definitiva não está prontamente disponível quanto à eficácia dos probióticos na cirurgia digestiva apesar dos esforços para comparar ensaios controlados randomizados (ECRs) utilizando probióticos para chegar a um consenso, o que fomenta ainda mais a busca de respostas assertivas sobre protocolos microbiológicos de uso dos probióticos em cirurgia.

2.2.2.1 Aplicação de probióticos na disbiose em cirurgia digestiva

Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e nos cuidados perioperatórios, as complicações infecciosas após a cirurgia digestiva continuam sendo um grande problema. Tem havido um grande interesse nas potenciais implicações da microbiota intestinal na prevenção de complicações infecciosas. Pacientes submetidos a cirurgias abdominais de grande porte apresentam diversos fatores de risco para quebra das barreiras estruturais e funcionais, o que pode afetar as inúmeras interações entre hospedeiro e microbiota. A administração de antibióticos, que altera os números gerais e a composição da microbiota (Borges-Canha *et al.*, 2015), diminui a competição por recursos limitados e libera nichos normalmente ocupados (Sassone-Corsi; Raffatellu, 2015).

Acumulam-se evidências de que vários tipos de cirurgia digestiva provocam mudanças distintas na microbiota intestinal, na qual espécies potencialmente nocivas florescem concomitantemente com a diminuição de espécies benéficas e AGCC (Rogers *et al.*, 2017b). Esses desequilíbrios microbianos – possivelmente induzidos pelo preparo pré-operatório do intestino, estresse cirúrgico, uso de antibióticos ou manipulação do intestino etc. – podem ser descritos como disbiose induzida por cirurgia ou disbiose cirúrgica. A transformação do fenótipo de virulência em resposta ao estresse do hospedeiro deve ser incluída nesse fenômeno (Stavrou; Kotzampassi, 2017).

Portanto a manipulação da microbiota intestinal para limitar a translocação bacteriana pode ser uma alternativa potencial para prevenir a infecção pós-operatória. A eficácia dos probióticos foi avaliada em uma variedade de estudos clínicos com a expectativa de reduzir a disbiose cirúrgica, melhorar a função imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, prevenir a translocação bacteriana, dentre outros benefícios. A maioria dos estudos relatou efeitos positivos do uso de probióticos em cirurgia gastrointestinal (Nakazaki, 1992a; Nova *et al.*, 2016; Rogers *et al.*, 2017b; Singh, Varun Pratap *et al.*, 2013).

2.2.3 Microbiota induzindo tumorigênese e resposta imune

A microbiota intestinal está envolvida nas principais etapas da carcinogênese, que incluem inflamação promotora de tumores, resposta imune alterada, crescimento tumoral, angiogênese, produção de metabolitos pró-carcinogênicos, dano ao DNA e indução de instabilidade genômica (Francescone; Hou; Grivennikov, 2014b; Louis; Hold; Flint, 2014; Nougayrède *et al.*, 2006; Reinhardt *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2016; Sethi *et al.*, 2018).

O sistema imunológico contém uma memória imunológica baseada em receptores de reconhecimento padrão (PRR), que são capazes de distinguir microrganismos potencialmente patogênicos de comensais inofensivos. Os PRR reconhecem principalmente moléculas de superfície derivadas de microrganismos, especialmente lipopolissacarídeos bacterianos, lipoproteínas, DNA procariótico e ácidos nucleicos, que podem ser chamados de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os receptores Toll-like (TLR) pertencem a uma classe principal de PRR e são expressos em membranas de macrófagos e em células dendríticas. Outro grupo de PRR são os receptores do tipo NOD (NLRs), os quais estão relacionados a uma grande família de receptores inatos citosólicos envolvidos na detecção de patógenos intracelulares e de subprodutos endógenos de lesão tecidual (Velloso *et al.*, 2019).

A disbiose intestinal favorece a invasão e o crescimento de espécies patogênicas e perturba a homeostase do sistema imunológico e da barreira mucosa. O processo inflamatório subsequente resulta em aumento da permeabilidade da mucosa e permite que os microrganismos intestinais orquestram um estado contínuo de inflamação, ativando assim a sinalização TLR e NLR (Velloso *et al.*, 2019).

A sinalização de TLR é traduzida por meio de proteínas adaptadoras como resposta primária de diferenciação mieloide-88 (MyD88) e interferon- γ indutor de adaptador contendo domínio TIR (TRIF). A sinalização de MyD88 e TRIF leva à expressão de citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 γ), interleucina-6 (IL-6), proteína 10 induzida por interferon gama (IP-10) e interferon- γ (IFN- γ) por meio da ativação de fatores transcricionais, fator nuclear κ B (NF- κ B), proteínas ativadora 1 (AP-1) e fator regulador do interferon 3 (IRF-3) (Piras; Selvarajoo, 2014). A ativação do NLR desencadeia o rearranjo estrutural do receptor para conduzir a propagação do sinal ativando múltiplas vias de sinal para induzir a formação de inflamassomas e/ou para ativar NF- κ B, quinases de estresse, IRFs, caspases inflamatórias e autofagia (Velloso *et al.*, 2019), o que propicia um ambiente inflamatório que favorecerá a disbiose intestinal.

A microbiota intestinal pode produzir metabolitos pró-carcinogênicos. Um bom exemplo de tal metabólito é o butirato, um ácido graxo de cadeia curta, que é produzido por espécies bacterianas por meio da fermentação anaeróbica de carboidratos e fornece uma importante fonte de energia para as células hospedeiras como os colonócitos. Embora o butirato tenha demonstrado em uma série de estudos ter efeitos anticancerígenos, no conhecimento genético relacionado, promove a carcinogênese por meio do aumento da proliferação de células epiteliais aberrantes (Bultman; Jobin, 2014).

2.2.4 Resposta imune ao câncer

Proteínas alteradas produzidas a partir de genes mutantes ou genes virais são reconhecidas como antígenos tumorais pelas células imunes, independentemente de sua função. Neoantígenos podem surgir a partir dessas proteínas tumorais alteradas e podem ser apresentados na superfície da célula tumoral via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Houghton; Guevara-Patiño, 2004).

Antígenos recém-formados na superfície das células tumorais são reconhecidos pelo sistema imunológico, o que desencadeia a resposta imune. A proliferação e a ativação de células T em tecidos tumorais requerem estimulação por duas vias. O primeiro sinal envolve a ligação entre os neoantígenos apresentando-os

à molécula de MHC e ao TCR. O segundo sinal é coinibitório ou coestimulatório e determina se as células T serão ativadas ou não (Houghton; Guevara-Patiño, 2004).

As células T têm receptores coestimuladores que se combinam com ligantes coestimuladores expressos na superfície das células tumorais promovendo a ativação destas. As células T devem receber coestimulação por meio do acoplamento de CD28 em sua superfície com CD80 ou CD86, que também são, respectivamente, conhecidos como B7-1 e B7-2 na superfície das células apresentadoras de antígeno. Os sinais entregues via CD28 afetam eventos cruciais nas células T como sinalização transcricional, modificações de proteínas pós-traducionais, síntese de citocinas e alterações epigenéticas que, em última análise, afetam seu fenótipo e sua função. Os ligantes CD80 e CD86 variam em seu padrão de expressão. O CD86 é constitutivamente expresso em células apresentadoras de antígeno e é regulado rapidamente durante as respostas imunes, enquanto o CD80 é mais lento em sua regulação positiva (Lenschow *et al.*, 1994).

Em contraste com os receptores coestimuladores descritos, as células tumorais produzem vários receptores coinibitórios, incluindo proteína de morte celular programada-1 (PD-1), gene de ativação de linfócitos 3 (LAG 3), imunoglobulina de células T e domínio de mucina-3 (TIM-3). A ligação entre os receptores coinibitórios e seus ligantes induz a inativação das células T (Wang, Zhengguang *et al.*, 2013).

A proteína de membrana PD-1 representa um receptor coinibidor que é encontrado na superfície de vários tipos de células como células T ativadas, células T reguladoras (Tregs) e monócitos. Possui dois ligantes: PD-L1 e PD-L2. O primeiro é expresso em células imunes e tumorais, enquanto o segundo é expresso principalmente em células apresentadoras de antígeno. Os linfócitos infiltrantes de tumor (TILS) liberam IFN- γ e induzem a expressão de PD-L1 em células tumorais circundantes, em células estromais e em células sanguíneas (Wang, Jiunn-Wei *et al.*, 2019). O PD-L1 que é expresso nas células tumorais se liga ao PD-1 nas células T ativadas que atingem o tumor e gera um sinal de supressão para a ativação das células T, que se tornam incapazes de destruir as células tumorais, o que leva a uma diminuição das células que fazem respostas imunes humorais (Freeman *et al.*, 2000; Wang, Jun *et al.*, 2017).

A via PD-1/PD-L1/2 parece proteger as células tumorais do ataque de linfócitos T. A proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) é uma molécula coinibidora exibida em linfócitos T ativados e em Tregs, cujo receptor nas células T

interage com seus ligantes B7-1/B7-2 localizados nas células apresentadoras de antígenos, e conseqüentemente suprime o sinal estimulador de células T mediadas por CD28 (Finn, 2008).

A expressão de CTLA-4 é estimulada apenas no contexto da ativação de células T; depois, compete com o CD28 para se ligar às moléculas B7 e para diminuir a resposta imune. As células T reguladoras (Tregs) expressam CD4, FOXP3 e CD25. As Tregs suprimem a resposta imune às autoproteínas e a resposta imune tumoral (Tanaka; Sakaguchi, 2017). Elas inibem a resposta imune tumoral produzindo receptor de interleucina-2 (IL-2) de alta afinidade, CTLA-4, IL-10 e citocinas imunossupressoras como o fator de crescimento transformador β (TGF- β). A expressão de LAG-3 está aumentada em células T ativadas e células natural *killer*, e seus ligantes são MHC classe II, LSEctina e galectina-3 (Liu, Biao *et al.*, 2013).

O LAG-3 inibe a proliferação de células T e a produção de citocinas. O TIM-3 se liga a seus ligantes, que incluem galectina-9, caixa de grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1) e molécula de adesão celular de antígeno carcinoembrionário 1, e desempenha um papel na evasão imune de células tumorais por inativar células T. O bloqueio desses sinais coinibitórios é a estratégia básica para a imunoterapia do câncer (Anderson; Joller; Kuchroo, 2016).

2.3 Tratamento cirúrgico do câncer gástrico

A primeira cirurgia de câncer gástrico com sucesso é atribuída a Schlatter em Zurich-Suíça, em 1897, que realizou a reconstrução do trânsito digestivo utilizando o jejuno em ômega com anastomose esôfago-jejunal no término lateral (Toneto *et al.*, 2012). No Brasil, foi realizada pela primeira vez por Arnaldo Vieira de Carvalho em São Paulo, em 1990 (Carvalho, 1990). A partir de então os cirurgiões passaram a utilizar esse procedimento mais rotineiramente embora com resultados pouco animadores, uma vez que as taxas de complicações operatórias eram muito elevadas. Nas décadas de 1940 e 1950, Lahey, em Boston, popularizou o procedimento, preconizando a gastrectomia total como tratamento de rotina (Lahey, 1949). No Brasil foi difundida por Paulino em 1984 (Andreollo; Lopes; Coelho Neto, 2011a).

A gastrectomia é considerada um procedimento de alta complexidade e deve ser realizada em hospitais de referência de alta complexidade, pois apresenta índices de morbidade-mortalidade importantes. As complicações desse procedimento

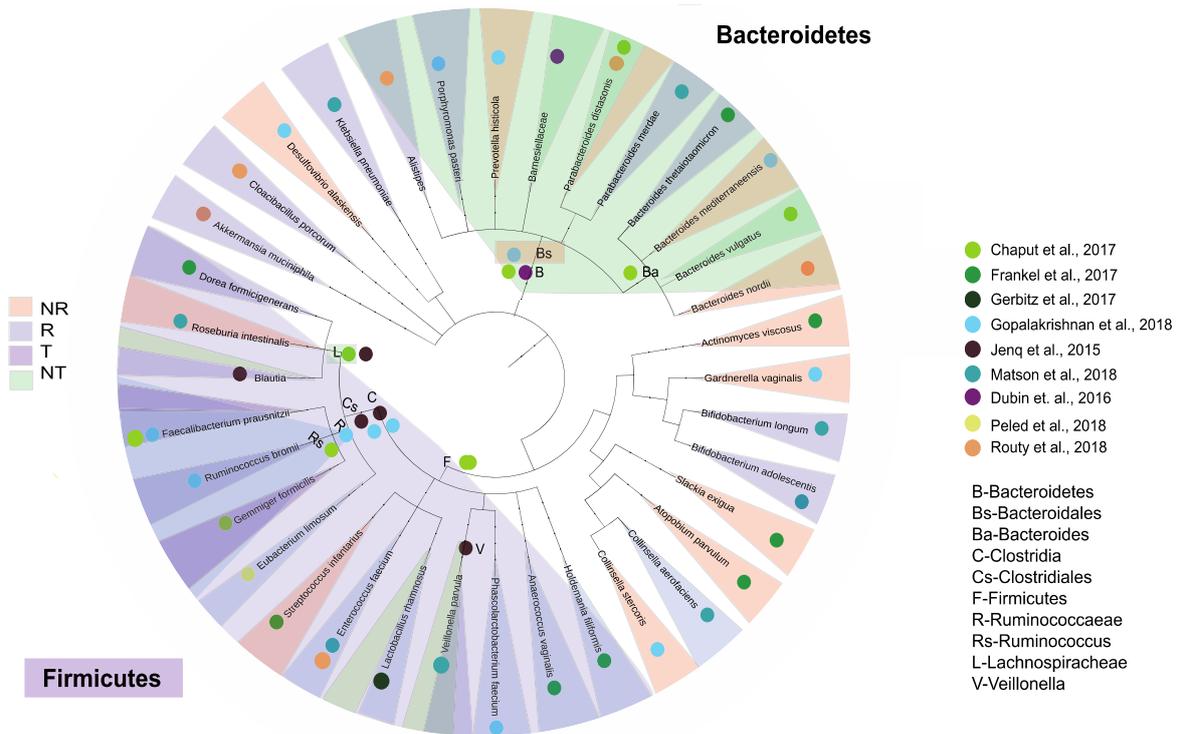
cirúrgico são mais elevadas, tanto locais quanto sistêmicas, pois os doentes na sua maioria estão com as condições clínicas e nutricionais previamente comprometidas pela doença. Além disso, requer tempo de hospitalização mais longo que as demais operações, cuidados pós-operatórios semi-intensivos ou intensivos, controles de infecção, manutenção do estado geral e realimentação (Jähne; Piso; Meyer, 2001).

2.4 A microbiota intestinal modificando o contexto cirúrgico no câncer gástrico

A biodiversidade intestinal pode ser descrita como microbioma (coleção de microrganismos, seus genes e metabolitos dentro de um ambiente) ou microbiota (os microrganismos) (Bays *et al.*, 2016). Estima-se que no trato gastrointestinal haja milhões de microrganismos, o qual é composto por mais de 1.000 tipos distintos de espécies e mais de três milhões de genes em comparação com aproximadamente 30.000 no genoma humano, o que demonstra uma via coevolucionária definida pela metagenômica (Parekh; Balart; Johnson, 2015). Essa microbiota tem demonstrado interagir com o hospedeiro de forma simbiótica modulando a inflamação e o sistema imunológico, agindo na biotransformação de xenobióticos e na absorção de micronutrientes, sintetizando vitaminas, enzimas e proteínas usadas pelo hospedeiro, fermentando substratos energéticos, fornecendo resistência a patógenos e mudando a quantidade de energia disponível na dieta (Nova *et al.*, 2016; Parekh; Balart; Johnson, 2015; Silva, Rafaella de Andrade *et al.*, 2016; Singh, Varun Pratap *et al.*, 2013).

O período perioperatório é considerado uma janela de oportunidade para determinar os resultados do câncer em longo prazo. A microbiota intestinal está relacionada não apenas à carcinogênese do câncer do trato gastrointestinal, mas também aos resultados pós-operatórios, bem como também de resposta à terapia citotóxica. Nesse contexto, observa-se na literatura que determinadas espécies são classificadas como respondedoras e não respondedoras por estarem ativamente ligadas a processos metabólicos que influenciam diretamente na eficácia da terapia escolhida, o que demonstra assim a influência fundamental do perfil de ecossistema microbiano de cada indivíduo (**Figura 5**) (Gaines *et al.*, 2018; Viaud *et al.*, 2013).

Figura 5 – Cladograma do perfil filogenético de pacientes em tratamento do câncer



Fonte: Adaptado de Gopalakrishnan *et al.* (Gopalakrishnan *et al.*, 2018).

2.4.1 Mudanças na barreira intestinal e seu impacto na composição da microbiota intestinal

Uma das alterações típicas no trato gastrointestinal após a gastrectomia subtotal inclui a perda da barreira gástrica devido à redução da secreção de ácido gástrico (Horvath *et al.*, 2021).

Um pH de 4 é considerado um valor limite para um poderoso efeito bactericida (Martinsen; Bergh; Waldum, 2005), o qual é significativamente alterado após a gastrectomia, pois o pH gástrico aumenta de níveis fisiológicos para valores acima de 6,0, independentemente do tipo de reconstrução. Um aumento muito semelhante no pH gástrico de aproximadamente 2,0 para mais de 6,0 é descrito após a ingestão de inibidor da bomba de prótons (IBP) (Horvath *et al.*, 2021). Em tais condições, as bactérias orais podem sobreviver durante a passagem gástrica e colonizar a parte distal do trato gastrointestinal, o que causa a oralização do microbioma intestinal, fenômeno descrito anteriormente em usuários de IBP (Bajaj *et al.*, 2014; Horvath *et al.*, 2021; Imhann *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2016). A perda comparável da função

da barreira gástrica após a gastrectomia subtotal e pelo uso de IBP pode resultar em um impacto semelhante no microbioma intestinal (Horvath *et al.*, 2021).

A inflamação intestinal crônica pode estar envolvida na patogênese da diarreia crônica intermitente ou permanente, que está presente em até 40% dos sobreviventes em longo prazo após a gastrectomia. A desregulação da expressão e/ou função dos transportadores e canais de íons epiteliais leva à retenção de eletrólitos e acúmulo de água, o que causa diarreia (Heiman; Greenway, 2016).

A perda da função de barreira epitelial contribui para a diarreia por meio de um mecanismo de fluxo de vazamento enquanto a penetração na mucosa de patógenos entéricos leva a danos teciduais subsequentes (Anbazhagan *et al.*, 2018). Além disso, os pacientes que são acometidos por diarreia após a gastrectomia mostraram uma abundância aumentada de *Mogibacterium* e diminuição da abundância de *Ruminococcus* (Anbazhagan *et al.*, 2018). *Mogibacterium* aumentou em pacientes portadores de doença de Crohn (QIU *et al.*, 2017), e a redução de *Ruminococcus* foi associada à diarreia em um modelo experimental porcino (Yang *et al.*, 2019).

Outros sintomas gastrointestinais comuns em pacientes gastrectomizados são desconforto abdominal e inchaço (Aoki *et al.*, 2012; Horvath *et al.*, 2021; Karanicolas *et al.*, 2013; Kim, Ae Ran *et al.*, 2012). Ambos os sintomas foram associados a uma diminuição da *Agathobacter* (Horvath *et al.*, 2021). Esses produtores de butirato vivem em simbiose com *Bifidobactérias*, que fornecem acetato como substrato para a produção de butirato (RIVIÈRE *et al.*, 2015). O desconforto abdominal também foi associado ao aumento da abundância de *Holdemanella* (Horvath *et al.*, 2021). Faltam evidências sobre o impacto da *Holdemanella* na saúde do hospedeiro embora sua família taxonômica *Erisipelotrichacea* contenha espécies altamente imunogênicas que estão associadas a condições pró-inflamatórias (Arumugam; Lau; Chamberlain, 2016).

A reconstrução do trato gastrointestinal após a gastrectomia pode levar à derivação biliar. O fluxo de ácido biliar alterado potencialmente estimula o crescimento de bactérias transformadoras de ácido biliar (Dhakan *et al.*, 2019). A desconjugação de ácidos biliares primários humanos e sua subsequente biotransformação em ácidos biliares secundários constituem uma função bem reconhecida realizada pelo microbioma intestinal humano com suas implicações para a saúde humana (Heinken *et al.*, 2019).

A reação de 7 α -desidroxilação tem sido descrita como o processo mais quantitativamente importante para a formação de ácidos biliares secundários realizada pela microbiota intestinal – em especial as bactérias que pertencem ao gênero *Clostridium* (Lin *et al.*, 2018a). O aumento da abundância de *Clostridium* após a gastrectomia foi confirmado em vários estudos (Dhakan *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2018a). A composição alterada do *pool* de ácidos biliares tem sido associada a várias doenças, inclusive câncer colorretal (Wirbel *et al.*, 2019; Yachida *et al.*, 2019).

Os mecanismos exatos que ligam a gastrectomia subtotal à melhora metabólica permanecem obscuros; no entanto algumas assinaturas microbianas intestinais que envolvem suas vias foram sugeridas (Lin *et al.*, 2018a), as quais incluem: (1) O impacto da microbiota intestinal na função enteroendócrina; (2) Fluxo de ácido biliar alterado, que é um *driver* para mudanças na composição da microbiota; e (3) Níveis diminuídos de lipopolissacarídeos circulantes e componentes bacterianos alterados que promovem a sensibilidade à insulina hepática (Lin *et al.*, 2018a).

2.5 O sequenciamento da microbiota intestinal

O advento da biologia molecular reduziu as limitações encontradas na utilização de métodos de cultivo além de revelar novas perspectivas sobre a diversidade de microrganismos existentes na microbiota intestinal humana (LI *et al.*, 2012). Metodologias de sequenciamento começaram a ser desenvolvidas em 1977 e, logo na primeira geração, culminaram na leitura completa do genoma humano, em 2003 (Pareek; Smoczynski; Tretyn, 2011).

Assim, estudos de genética molecular foram empregados para identificação do microbioma humano como o Projeto Microbioma Humano (HMP) iniciado em 2008, que teve por objetivo caracterizar e analisar as comunidades microbianas encontradas em vários locais do corpo humano, o que auxilia na melhor compreensão da microbiota endógena humana e permite elucidar suas relações com o hospedeiro (Structure, Function And Diversity Of The Healthy Human Microbiome, 2012).

O rápido avanço nas tecnologias de sequenciamento permitiu um crescimento exponencial no número de estudos em metagenoma (Yachida *et al.*, 2019). No entanto, a depender do objetivo a que se debruça a ciência, cabe a escolha dos métodos de tipo do estudo (gene 16s rRNA ou *Shotgun*), extração de DNA, montagem de bibliotecas e análise dos dados de bioinformática. Essa padronização, permite, por

exemplo, a realização de meta-análises dos estudos de microbioma sequenciados por meio da metodologia escolhida, o que é difícil atualmente devido a erros de desenho de estudo e seleção de técnicas ou falhas no registro de procedimentos e dados (Knight *et al.*, 2018).

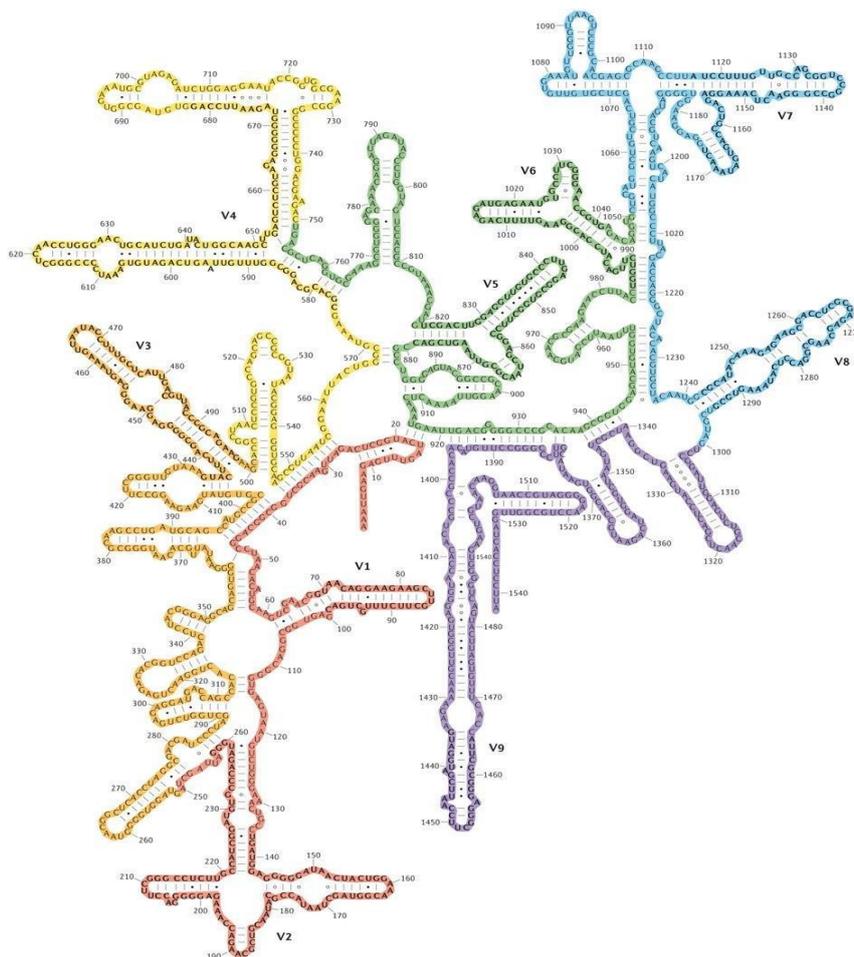
Dentre as técnicas de primeira geração, podem-se citar as de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos e posteriormente técnicas de sequenciamento emparelhado (Silva, Ygor Parladore, 2018). A metodologia de Sanger é utilizada ainda hoje de forma automatizada e com detecção de fluorescência para sequenciamento e para validação de dados de nova geração (Silva, Ygor Parladore, 2018).

A partir de 2004 houve um grande crescimento no número de sequências geradas em estudos de genoma e, posteriormente, metagenoma. Isso foi possível graças ao advento do sequenciamento de nova geração em larga escala (HT-NGS, ou apenas NGS), cujas principais técnicas empregadas são pirosequenciamento, sequenciamento por síntese, por ligação e torrente de íons. Todas as tecnologias de NGS têm em comum a produção de uma biblioteca de sequências, seja por clivagem, seja por adição de adaptadores, além do uso de uma superfície sólida com ligantes dos adaptadores para formação de *clusters* (Pareek; Smoczynski; Tretyn, 2011).

O principal alvo molecular para a análise das comunidades bacterianas é a subunidade menor do RNA ribossomal, 16s rRNA, que possui regiões de sequências de bases de nucleotídeos altamente conservadas no domínio bacteriano, intercaladas por regiões variáveis a altamente variáveis, que possibilitam estudos de caracterização filogenética de grupos e de espécies de bactérias. Essas regiões são nomeadas de V1 a V9 (**Figura 6**) (Chaia; Oliver, 2003).

De modo geral, a região V4 é a mais utilizada em estudos de microbioma por representar fielmente o perfil taxonômico das comunidades microbianas quando comparada à caracterização utilizando a sequência completa do gene 16s rRNA (Zhou *et al.*, 2019).

Figura 6 – Regiões variáveis do RNA ribossomal 16s



Fonte: Adaptado de (Yarza *et al.*, 2014).

Nota: As regiões variáveis do RNA ribossomal 16s estão representadas por cores diferentes. Em vermelho estão representadas as regiões V1 e V2; em laranja, a região V3; em amarelo, a região V4; em verde, as regiões V5 e V6; em azul, as regiões V7 e V8; e em roxo, a região V9.

2.5.1 Diferentes estratégias de sequenciamento e bioinformática para análise do microbioma humano

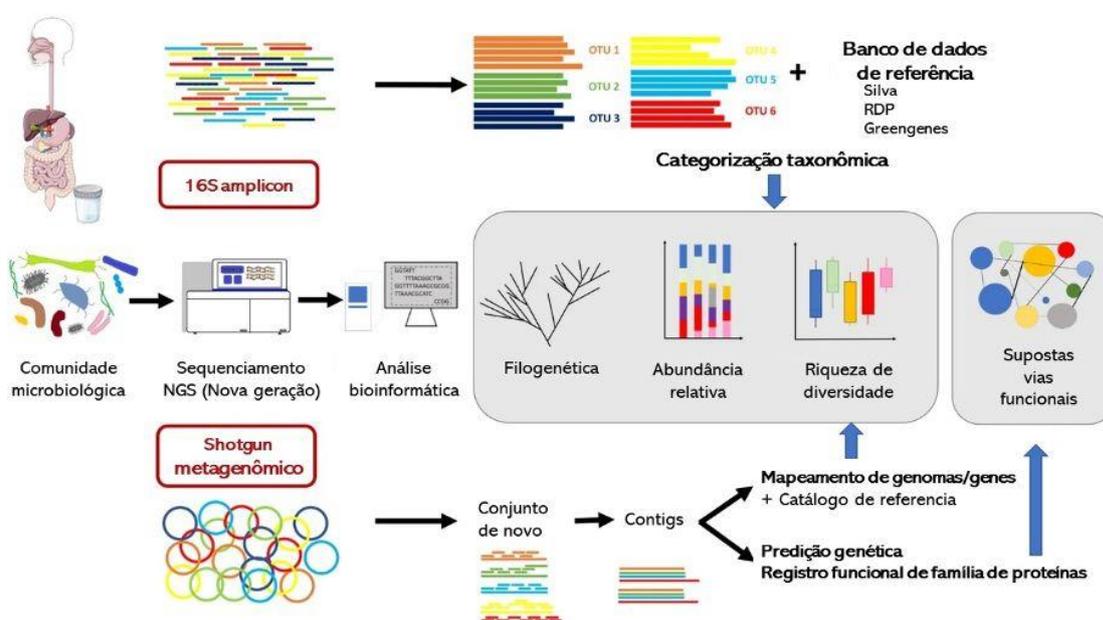
Na avaliação do perfil do gene 16s rRNA, as sequências brutas obtidas são passadas por filtros de qualidade para minimizar a presença de artefatos de sequenciamento. As leituras de sequência filtradas resultantes são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que representam organismos semelhantes. Depois disso, a identidade taxonômica é atribuída para cada OTU com base na homologia de sequência constante no banco de dados de genes de rRNA 16s conhecidos, e a abundância relativa de cada OTU é calculada para cada amostra.

A tabela de OTUs resultante também é usada para quantificar a diversidade populacional dentro e entre as amostras, como as medidas de diversidade alfa e beta, respectivamente.

Nas abordagens realizadas com metodologia *shotgun*, são realizadas análises metagenômicas, metatranscriptômicas e virômicas (**Figura 7**). Na análise metagenômica, as sequências de DNA obtidas podem ser mapeadas para genomas/genes de referência ou usadas para montagem de novos genomas. Então a abundância relativa dos presentes genomas/genes e o potencial funcional das sequências podem ser avaliados usando bancos de dados funcionais anotados (Bikel *et al.*, 2015).

Na análise virômica, primeiro as partículas virais devem ser enriquecidas e posteriormente sequenciadas para obter os genomas do vírus. Além disso, para analisar os genes e as espécies ativas do microbioma, a análise metatranscriptômica é aplicada, e as sequências de RNA obtidas são mapeadas para vias e genes de referência. Os resultados são usados para identificar as vias ativas, genes e microrganismos. Assim, a abundância relativa de cada via/gene/microrganismo ativo no microbioma humano é determinada. A montagem de novos genomas e transcriptomas também pode ser realizada para identificar novos genomas ou vias (Bikel *et al.*, 2015; Szychowiak *et al.*, 2022).

Figura 7 – Diferentes métodos para avaliar a microbiota intestinal



Fonte: Adaptado de Szychowiak (Szychowiak *et al.*, 2022).

2.6 Estratégias de identificação de DNA em amostras fecais

O processo de isolamento de DNA é uma etapa crucial para a obtenção do material de partida para técnicas biomoleculares. Dessa forma, o método empregado deve levar em consideração a amostra que será utilizada e o tipo celular do qual se pretende extrair. Procedimentos convencionais envolvem uma etapa de preparação da amostra, seguida por lise química ou mecânica de membranas celulares, precipitação de material orgânico (proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos), precipitação e lavagem de material genético e eluição final (Silva, Ygor Parladore, 2018).

O uso de amostras de fezes para extração de DNA é vantajoso por ser um método não invasivo, de fácil aderência por participantes, e por representar uma amostra parcialmente fidedigna da microbiota intestinal (Thomas; Clark; Doré, 2015), cujo isolamento do DNA é um desafio devido à variedade de microrganismos e de tipos de membranas e paredes encontradas. Esse fator dificulta a implementação de um protocolo único de extração, que deve ser eficiente para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de, idealmente, fungos e protozoários (Yarza *et al.*, 2014).

A composição das fezes também pode representar um fator dificultante para obtenção de DNA de qualidade. Por exemplo, o excesso de alguns inibidores presentes nas fezes são polissacarídeos complexos, lipídios, uratos e sais biliares que não são removidos por qualquer método de extração (Angelakis *et al.*, 2016), e eles atuam como inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR) devido à precipitação de ácidos nucleicos e à degradação da enzima (Schrader *et al.*, 2012).

Já foi demonstrado que, em estudos de microbioma humano, a metodologia de extração do DNA de amostras de fezes é o maior fator de viés na composição ecológica encontrada por sequenciamento. Ou seja, variações nos protocolos de processamento da amostra acabam por interferir na diversidade de espécies encontradas e, portanto, nos resultados obtidos (Angelakis *et al.*, 2016). Isso ocorre provavelmente porque essa é a etapa do estudo de microbiota com maior variedade de métodos e com menor padronização.

Métodos de extração de DNA de fezes são desenvolvidos continuamente no intuito de aumentar a eficiência de extração e possibilitar o sequenciamento metagenômico mais representativo possível. Nesse sentido, alguns métodos propostos são de tiocianato de guanidina com sílica, sistema polietilenoglicol e

dextrano, fenol-clorofórmio, chelex 100. No entanto vários desses apresentam limitações quanto à composição, à quantidade e ao pré-tratamento necessário do material utilizado. Embora métodos independentes de extração de DNA possam ter etapas padronizadas e protocolos prontos, sempre é necessário testar sua reprodutibilidade no laboratório de trabalho, principalmente quando são feitas adaptações para moldá-los à realidade prática do orçamento (Silva, Ygor Parladore, 2018).

Um exemplo de protocolo independente projetado para extração de DNA de fezes é o de Zoetendal e col. (Zoetendal *et al.*, 2006), que consiste em utilizar amostras de fezes frescas que podem ser congeladas a -20°C ou armazenadas em tampão TE (Tris-HCl e EDTA), o que faz parte do protocolo de extração. São usadas pérolas de zircônio para lise mecânica das células e fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico para isolamento do DNA. O protocolo serve de base para execução de estudos em microbioma humano, mas tem potencial para adaptação a outras aplicações de microbioma (Zoetendal *et al.*, 2006).

2.7 Modulação intestinal e seus possíveis efeitos: o que sabemos?

2.7.1 Transplante de microbiota fecal

Embora o transplante de microbiota fecal esteja apenas começando a ser investigado no contexto do câncer, essa terapia tem sido extensivamente estudada em doenças gastrointestinais simbióticas, especificamente em infecção por *Clostridium difficile* (Hataye; Palmore; Powers, 2013; Wang, Jiunn-Wei *et al.*, 2019) e em doença inflamatória intestinal (Paramsothy *et al.*, 2017). O conhecimento adquirido com o transplante de microbiota fecal nessas doenças pode guiar o desenho do tratamento do câncer (Wang, Jiunn-Wei *et al.*, 2019).

Com o transplante de microbiota fecal, um ecossistema microbiano entérico inteiro é transplantado do doador ou doadores oferecendo múltiplas vantagens potenciais sobre a entrega de bactérias benéficas únicas. No entanto o enxerto de bactérias introduzidas pode ser mais robusto no cenário de um transplante comunitário inteiro com menor exclusão competitiva pelo microbioma receptor (Wang, Jiunn-Wei *et al.*, 2019).

2.7.2 Uso de probióticos

Probióticos, que podem ser encontrados na forma de suplemento ou de alimento fermentado (por exemplo, iogurte, kefir, chucrute, kombucha, missô ou kimchi), são definidos como microrganismos vivos que putativamente conferem um benefício à saúde do hospedeiro a quem são administrados. As vantagens dos suplementos probióticos são a facilidade de uso e a acessibilidade, no entanto existem lacunas substanciais e variações na padronização, controle de qualidade, biodisponibilidade e modulação de alvo (Kristensen *et al.*, 2016) (**Quadro 1**).

2.7.3 Dieta

A dieta pode desempenhar um papel na regulação da inflamação intestinal crônica; vários alimentos e componentes alimentares têm impacto nas concentrações sanguíneas de marcadores inflamatórios, inclusive citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão solúveis e receptores de citocinas, e podem acarretar disbiose intestinal, que levaria à supressão de genes reparadores de tumor (Minihane *et al.*, 2015). Diferentes estudos epidemiológicos avaliaram a associação entre o potencial inflamatório da dieta, medido por meio do índice inflamatório desta – um índice que combina a ingestão de constituintes da dieta com marcadores inflamatórios conhecidos (Fan *et al.*, 2017; Shivappa; Prizment; *et al.*, 2014; Shivappa; Steck; *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2019) e relacionados também ao desenvolvimento de tumores gastrointestinais (Shivappa; Steck; *et al.*, 2014; Shivappa; Hébert; Rashidkhani, 2015).

Sabe-se que há poucas diretrizes alimentares suficientes e específicas ou baseadas em evidências fortes para compartilhar com os pacientes após o diagnóstico do câncer apesar das investigações exaustivas e da convicção geral de que a dieta é um componente importante da saúde e pode influenciar diretamente no caso dos tumores do TGI. Essa lacuna é devida, em parte, à coleta insuficiente de dados alimentares em ensaios e coortes clínicas e à escassez de estudos prospectivos intervencionistas sobre dieta, o que mostra mudanças na resposta ao câncer e nos resultados de sobrevida e até no tratamento (Clinton; Giovannucci; Hursting, 2020).

Diversos trabalhos tentam associar o tipo de dieta alimentar ao risco maior de doenças crônicas tais como o câncer, sendo interessante apontar que esses fatos

ainda não conseguem ser totalmente elucidados pela ciência tendo em vista alguns fatores de confundimento sobre a exposição de certos alimentos e o risco de alguns tipos de cânceres. É bem documentada, contudo, a relação muito próxima que existe entre o consumo de alimentos ultraprocessados e carnes vermelhas e o câncer gastrointestinal em diversas populações (O’Keefe, 2016; Quigley, 2019).

Na população do Amazonas existe um elevado índice de câncer gástrico, o que a deixa em segundo lugar no *ranking* de estimativas em 2020 (por taxa bruta), e são escassos dados científicos que associem o padrão da dieta alimentar local com o acometimento desse tipo de câncer.

Quadro 1 – Métodos de modulação da microbiota

Vantagens		Desvantagens	Considerações
Transplante de microbiota fecal	Transplante de todo o ecossistema; é direto	Escalabilidade (difícil de acessar e cara); riscos processuais; potencial para transferir outras doenças	Seleção de doadores (resposta completa ao transplante de microbiota fecal <i>versus</i> doador saudável); mecanismo de entrega; necessidade de regime de condicionamento; forma como sustentar; bancário para potencial futuro transplante autólogo
Probióticos e consórcios bacterianos	Fáceis de usar; acessíveis	Enxerto variável na definição de comensais concorrentes; potencial para diminuir a diversidade geral de microbiomas; biodisponibilidade variável; regulamentos insuficientes sobre controle de qualidade	Uso de esporos <i>versus</i> bactérias vivas; quais bactérias incluir; personalização; necessidade de regime de condicionamento
Prebióticos (fibras e suplementos de fibras)	Fáceis de usar; acessíveis	Alimentos integrais podem ser mais importantes do que suplementos nutricionais isolados (regulamentados como alimentos, e não como medicamentos)	Fibra simples <i>versus</i> mistura; previsibilidade da resposta dada à comunidade bacteriana residente

Dieta	Mudança holística que pode ter outros benefícios à saúde	Baixa conformidade; difícil de sustentar; efeitos variados	Deve-se direcionar nutrientes específicos <i>versus</i> padrão geral; dose necessária para a modulação-alvo; duração necessária; previsibilidade da modulação dada a variação do hospedeiro no microbioma e no metabolismo
--------------	--	--	--

Fonte: O autor (2022)

2.8 Impacto do câncer no estado nutricional

Desde o estudo clássico de Studley (1936), é conhecida a relevância da perda de peso no prognóstico, especialmente nas complicações pós-operatórias, sobretudo nos pacientes com câncer no trato digestivo (Mueller *et al.*, 2017). Na atualidade, a avaliação nutricional de pacientes cirúrgicos oncológicos não tem sido objeto de pesquisas devido à maior morbidade e mortalidade observada em pacientes subnutridos (Peng *et al.*, 2012). Sabe-se que a subnutrição influencia diretamente no sistema imunológico, aumentando o risco de infecções e comprometendo a capacidade de cicatrização. Além disso, o hipermetabolismo induzido pelo procedimento cirúrgico leva a uma maior demanda de energia e proteína, o que pode resultar ou contribuir para a piora do estado nutricional de tais pacientes (Weimann *et al.*, 2017).

A subnutrição está associada com a redução da qualidade de vida, menor resposta ao tratamento com quimioterapia adjuvante (Salas *et al.*, 2008; Tian; Chen, 2005), maior risco de toxicidade dos sistemas hepático e renal induzida pela quimioterapia e pode até corroborar o atraso no tratamento do câncer (Cessot *et al.*, 2011; Fujitani *et al.*, 2016; Tian; Chen, 2005) e o pior prognóstico em pacientes com câncer gástrico, sendo observadas complicações no pós-operatório, tais como náuseas, vômitos, deiscência de sutura, infecção e até óbito (Fujitani *et al.*, 2016; Tian; Chen, 2005). Adicionalmente, a presença de efeitos adversos da quimioterapia e seu impacto nutricional como náuseas, vômitos, diarreia e anorexia agravam ainda mais o estado nutricional e imunológico desses pacientes (Halpern-Silveira *et al.*, 2010).

2.9 O papel das citocinas inflamatórias

As principais citocinas que influenciam na resposta de fase aguda no câncer gástrico são principalmente interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Gulen *et al.*, 2012; O’Riordain *et al.*, 1999). Em pacientes com neoplasias, as citocinas apresentam um padrão funcional complexo, e a expressão de uma citocina pode ser induzida ou suprimida por outra (Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014), cujo efeito foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (NAKAZAKI, 1992). Por exemplo, o estímulo com TNF- α aumenta a produção de IL-1, que por sua vez estimula a produção de IL-6, que contribui extensivamente para aumentar a progressão da doença (Carter *et al.*, 1990; Nakazaki, 1992b; Roshani; McCarthy; Hagemann, 2014).

Classicamente as citocinas pró-inflamatórias são produzidas pela maioria das células do organismo, especialmente pelos macrófagos e pelas células de resposta humoral também observadas no intestino humano (Cavaillon, 1994). Tais células exercem um papel fundamental na imunocompetência pelo seu alto potencial secretório, sendo responsáveis pela liberação de mais de cem substâncias, como as citocinas, o óxido nítrico, o ânion superóxido e as macromoléculas como os proteoglicanos próprios de algumas bactérias da microbiota intestinal humana (Nathan, 1987).

Pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear, os macrófagos constituem uma linha de defesa contra elementos estranhos ao organismo. Eles originam-se dos monócitos circulantes e migram para todos os tecidos corporais. São encontrados em maior quantidade em tecidos conectivos, especialmente no trato gastrointestinal, nos pulmões (interstício e alvéolos), no fígado (células de Kupffer), na pele (células de Langerhans) e no baço, onde removem as células sanguíneas senescentes. Os macrófagos também podem ser encontrados na cavidade peritoneal, onde se classificam de acordo com os estágios funcionais de sua ativação (Crawford *et al.*, 1987). As células ativadas apresentam vários marcadores específicos em sua membrana, possuem maior número de mitocôndrias e lisossomos, assim como expressam e secretam mais enzimas lisossomais e fatores de crescimento (Argilés; Busquets; López-Soriano, 2003).

As citocinas são proteínas biologicamente ativas que atuam no sistema imune caracterizando a inflamação, além de outras funções corporais (Pedersen; Febbraio,

2005). As citocinas pró-inflamatórias são consideradas as principais indutoras da lipólise e da proteólise nos diversos tecidos (Batista *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2018), além de diminuírem a produção de diversos agentes anabólicos e de alterarem o perfil de hormônios como a leptina, neuropeptídeo Y, melanocortina, grelina, insulina, galamina, colecistoquinina e endorfina. Tais efeitos podem comprometer o metabolismo energético e afetam o funcionamento do fígado, dos músculos e do tecido adiposo (Gong *et al.*, 2018; Skipworth *et al.*, 2010; Ströhle; Zänker; Hahn, 2010).

2.9.1 Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional produzida por macrófagos, células T e células natural *killer* (Shi; Qu; Hou, 2014). Essa citocina atua sobre diferentes tipos celulares na fisiologia normal, na doença autoimune, assim como na inflamação aguda e crônica, além de relacionar-se ao câncer, podendo agir diretamente no estado clínico do paciente (Balkwill, Frances, 2006; Cui, Ming *et al.*, 2015).

2.9.2 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 desempenha papel na inflamação, na angiogênese, na sustentabilidade e na progressão tumoral (Ikeguchi *et al.*, 2009; Kim, Do-Kyong *et al.*, 2009; Wang, Jiunn-Wei *et al.*, 2019). A IL-6 sérica é conhecida por ser produzida tanto por células hematopoiéticas quanto por células epiteliais. Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α são capazes de induzir a produção de IL-6 a partir de células tumorais do hospedeiro (Strassmann *et al.*, 1993). Essa citocina desempenha papel fundamental na promoção da perda de tecido adiposo em pacientes com câncer (Rydén *et al.*, 2008).

2.9.3 Interleucina 1 e seu receptor solúvel

Tem sido atribuído à IL-1 um papel de mediador inflamatório e da resposta imune. A família IL-1 inclui IL-1 α , IL-1 β e o receptor solúvel do IL-1 (IL-1R). A IL-1 α e a IL-1 β se ligam ao mesmo receptor e exibem atividades biológicas similares

(Lopetuso; Chowdhry; Pizarro, 2013). Por esse mecanismo, a IL-1 α e a IL-1 β induzem a expressão de genes pró-inflamatórios e perpetuam a inflamação (Apte; Voronov, 2008). Por outro lado, a IL-1R é uma citocina anti-inflamatória que se liga aos receptores IL-1R do tipo I e II sem promover um sinal de ativação (McIntyre *et al.*, 1991). A IL-1R exerce efeito competitivo antagônico com a ligação de IL-1- α e IL-1 β ao IL-1R tipo I e II, possivelmente alterando a conformação molecular do receptor (Apte; Voronov, 2008). Por esse mecanismo, a IL-1R é um inibidor fisiologicamente ativo de IL-1 (Apte; Voronov, 2008; Shimamura *et al.*, 2000).

Nas células tumorais, a IL-1 também se liga aos receptores específicos na superfície da membrana e influencia na proliferação e na diferenciação celular (England *et al.*, 2014). Estudo *in vitro* com células gástricas neoplásicas mostrou que a IL-1 α atua na interação entre as células neoplásicas e o microambiente tumoral, promovendo a angiogênese e o aumento do poder metastático (Gong *et al.*, 2018). A IL-1 β está associada à ocorrência de múltiplos tumores malignos (Al-Tahhan; Etewa; El Behery, 2011; Chen, Miao-Fen *et al.*, 2012), dentre eles o câncer (Yin *et al.*, 2015). Em estudos *in vitro* com células de tumor gástrico neoplásicas, a IL-1R inibiu o potencial metastático e angiogênico (Gong *et al.*, 2018) por bloqueio de sinalização de IL-1 α e do fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor – VEGF) (Gong *et al.*, 2018).

2.9.4 Interferon gama (INF- γ)

O IFN- γ é produzido por linfócitos T citotóxicos ativados, macrófagos e células natural *killer* ativadas, com atividade biológica sobreposta à do TNF- α . Suas propriedades podem ser resumidas em: a) imunorregulatória; b) antiviral; c) antitumoral. O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada como mediadora de um mecanismo extrínseco de supressão do tumor em hospedeiros imunocompetentes (Argilés; Busquets; López-Soriano, 2011). Em camundongos tratados com IFN- γ , houve uma resposta antitumoral em sarcomas transplantados (Bui *et al.*, 2006). Além disso, o IFN- γ secretado por células T natural *killer* levou a efeitos antitumorais em estudos experimentais com tumores transplantados, induzidos quimicamente ou de aparecimento espontâneo (Chang, Chun-Jung *et al.*, 2007).

2.9.5 Interleucina 10-IL 10

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida por macrófagos, células T e linfócitos B e pode estimular e/ou reprimir a resposta imune (Howard *et al.*, 1992). É considerada uma potente citocina imunossupressora com papel vital na regulação da resposta imune e limita o dano tecidual excessivo causado pela resposta inflamatória nas infecções bacterianas e virais. Além disso, exerce função supressiva pela regulação decrescente de várias citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação das vias de sinalização JAK-STAT (Ouyang *et al.*, 2011). Ademais, inibe a produção de proteína quimiotática de monócitos 1 pelos adipócitos (Biswas; Sodhi, 2004), atrai monócitos, linfócitos T e células natural *killer* para o local da inflamação e inibe a produção e a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por monócitos cultivados (Batista *et al.*, 2012). Por outro lado, foi demonstrado que essa citocina inibe várias funções imunes, tais como apresentação de antígenos, produção de citocinas, ativação de macrófagos e proliferação de células T específicas de antígenos. Ao interferir no antígeno, a IL-10 reduz a proliferação de células T específicas para aquele determinado antígeno. Além disso, tem sido proposto que a IL-10 desempenha um papel fundamental na capacidade oncogênica e metastática de neoplasias (Holland; Zlotnik, 1993; Nabioullin *et al.*, 1994).

A IL-10 é uma das citocinas imunossupressoras cuja concentração está elevada no sangue de pessoas com câncer gástrico avançado (De Vita *et al.*, 1999; Szkaradkiewicz *et al.*, 2010). Isso sugere que há incapacidade em eliminar as células neoplásicas do microambiente tumoral. De fato, as próprias células gástricas cancerosas podem secretar IL-10, o que pode explicar sua redução nos pacientes após a remoção do câncer gástrico (Wang, Zhengguang *et al.*, 2013).

2.9.6 Quimiocinas CXCL-8

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas pequenas e solúveis que são capazes de se ligar aos seus receptores cognatos acoplados à proteína G, estimulando assim a migração, a adesão ou a quimiotaxia das células (Cabrero-de las Heras; Martínez-Balibrea, 2018).

Estruturalmente, são divididas em quatro subgrupos de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína N-terminais (CXC, CX3C, CC e C) (Raman *et al.*, 2007).

Uma série de investigações indicaram que essas proteínas podem facilitar a progressão do tumor, o que as tornou o foco dos esforços de investigação. CXCL-8 (Quimiocina 8 com motivo C-X-C), também conhecida como IL-8 (interleucina-8), é produzida principalmente por macrófagos e, portanto, é a principal responsável pela quimiotaxia de neutrófilos em direção ao local de um processo inflamatório (Miller; Mayo, 2017).

Foi sugerido que essa proteína pode desempenhar um papel na progressão tumoral, principalmente regulando o processo de angiogênese, crescimento e proliferação tumoral, bem como a sobrevivência de células malignas. Vários estudos demonstraram a expressão de CXCL-8 em células endoteliais, macrófagos associados a tumores e células cancerígenas, incluindo tumores gastrointestinais (Chang, Wen-Jun *et al.*, 2014).

Além disso, alguns autores indicaram que a superexpressão de CXCL-8 está correlacionada com a presença de metástases a distância e com a progressão geral do tumor, o que pode indicar a potencial utilidade dessa proteína como marcador de progressão dessa doença (Lee, Y S *et al.*, 2012).

2.9.7 Interleucina-12-IL-12

A interleucina-12, p70 (IL-12 p70) é uma citocina heterodimérica de 70 kDa ligada por dissulfeto e composta por uma subunidade de 197 aminoácidos de 35 kDa (p35) e uma subunidade de 306 aminoácidos de 40 kDa (p40). É produzida naturalmente por células dendríticas, macrófagos e células linfoblastoides B humanas em resposta à estimulação antigênica. Estimula o crescimento e a função das células T, a produção de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) de células T e células natural *killer* (NK) e reduz a mediada por IL-4 supressão de IFN- γ . Foi relatado que a IL-12 está associada a condições autoimunes e inflamatórias. Níveis plasmáticos aumentados de IL-12 também podem ser detectados em pacientes com distúrbios neurológicos como esclerose múltipla (Heufler *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 2020).

2.9.8 Interleucina 2, IL-2

A interleucina-2 (IL-2) foi descoberta como um fator de crescimento autócrino para células T cultivadas e foi a primeira citocina clonada em 1983 (Taniguchi *et al.*, 1983). Seu papel na estimulação da proliferação de células T e na geração de células T efetoras e de memória foi logo estabelecido em camundongos e em humanos. Isso levou a ensaios clínicos para avaliar a capacidade de doses elevadas de IL-2 para estimular respostas imunitárias antitumorais em pacientes com melanoma, cancro renal e outros tumores (Rosenberg, 2014). Em verdade, a IL-2 foi a primeira substância biológica produzida utilizando-se tecnologia de ADN recombinante, que foi administrada a humanos com câncer ou AIDS/SIDA para aumentar o número e a função das células T – e assim se lançaram as bases para o que tem sido uma das grandes revoluções na ciência biomédica e na medicina clínica. O sucesso da IL-2 como imunoterapia para o câncer foi limitado pelas toxicidades causadas pelas doses elevadas que tiveram de ser administradas, incluindo a síndrome de vazamento vascular e outras manifestações de uma tempestade de citocinas; e ainda hoje continua a ser um tratamento com utilidade limitada (Abbas, Abul K. *et al.*, 2018).

2.9.9 Interleucina 17a-IL-17a

Os membros da família das citocinas IL-17 têm diversas funções biológicas e não só promovem imunidade protetora contra muitos patógenos, mas também conduzem patologia inflamatória durante infecção e autoimunidade. IL-17A e IL-17F são produzidas por células T CD4⁺ e CD8⁺, células T $\gamma\delta$ e várias populações de células imunes inatas em resposta à IL-1 β e à IL-23 e medeiam a imunidade protetora contra fungos e bactérias promovendo o recrutamento de neutrófilos, a produção de peptídeos antimicrobianos e a função de barreira aprimorada. A inflamação causada pela IL-17 é normalmente controlada pelas células T reguladoras e pelas citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF β e IL-35 (McGeachy; Cua; Gaffen, 2019). No entanto, se desreguladas, as respostas da IL-17 podem promover imunopatologia no contexto de infecção ou autoimunidade. Além disso, a IL-17 tem sido implicada na patogênese de muitas outras doenças de base inflamatória, incluindo doenças cardiovasculares e neurológicas. Consequentemente, a via da IL-17 é agora um alvo-chave de

medicamentos em muitas doenças autoimunes e inflamatórias crônicas; anticorpos monoclonais terapêuticos direcionados à IL-17A, tanto IL-17A quanto IL-17F, e o receptor de IL-17 ou IL-23 é altamente eficaz em algumas dessas doenças (McGeachy; Cua; Gaffen, 2019).

2.9.10 Interleucina 4-IL-4

A IL-4 tem sido chamada de “citocina imunorreguladora prototípica”. Como muitas citocinas, ela pode afetar uma variedade de células-alvo de diversas maneiras. No entanto tem um papel único e importante na regulação da produção de anticorpos, na hematopoiese, na inflamação e no desenvolvimento de respostas de células T efetoras. A expressão desregulada de IL-4 tem sido implicada em alergia, crescimento autócrino de tumores e suscetibilidade a algumas doenças infecciosas. Mas também pode desempenhar um papel protetor na imunidade de alguns parasitas extracelulares, na supressão de uma resposta autoimune e na resistência tumoral. Variáveis como a quantidade relativa, o tempo e o local de expressão, bem como outros sinais que uma célula recebe em conjunto com a IL-4, devem influenciar se essa citocina tem um efeito protetor ou deletério sobre esses processos fisiológicos.

Os efeitos biológicos da IL-4 são mediados por receptores de IL-4 de alta afinidade. Esse receptor de duas cadeias é encontrado na maioria das células de linhagem hematopoiética, bem como em algumas células não hematopoiéticas, o que atesta sua importância. Ele consiste em uma cadeia de ligação ao ligante específico de IL-4 (α) e uma cadeia de sinalização (γ_c), que é compartilhada com diversas outras citocinas, incluindo IL-2 e IL-7 (Brown; Hural, 2017). Os níveis de expressão de IL-4R variam entre 100 a 5.000 receptores por célula. Embora algumas informações sobre os eventos intracelulares iniciais que são desencadeados pela ligação cruzada do receptor de IL-4 tenham sido descritas, ainda não está claro exatamente como o receptor de IL-4 transduz sinais que levam à expressão gênica diferencial em diversas espécies e tipos de células (Villagran *et al.*, 2021a). Uma chave para a compreensão desses fenótipos distintos induzidos por IL-4 pode ser a identificação de fatores de transcrição específicos, como o recentemente descrito STF IL-4 ou IL-4 STAT, que são ativados após exposição celular à IL-4 em células estimuladas (Brown; Hural,

2017), tendo também papel fundamental no prognóstico de câncer gástrico, sobre o que se discorrerá mais nos próximos subtítulos (Song *et al.*, 2021).

2.9.11 Citocinas inflamatórias e o câncer gástrico

No processo de desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, a estimulação da resposta imune do hospedeiro desempenha papel fundamental, produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-6, IL-1 β , que atraem e ativam neutrófilos e monócitos, o que causa inicialmente uma reação de doença inflamatória que pode evoluir para gastrite crônica. A infecção por *H. pylori* também produz infiltração de células dendríticas e linfócitos T e B e estimula a produção de proteína quimiotática de macrófagos MCP1, TNF α IL-10 e IL-12, fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e interferon gama (IFN γ) (Sánchez-Zauco *et al.*, 2017).

Foi demonstrado experimentalmente que durante a infecção por *H. pylori* um viés no equilíbrio entre as células Th1/Th2 pode ocorrer em favor destas últimas, reduzindo a secreção de IL-12 (Senchukova, 2022).

Existem evidências que apoiam a participação das citocinas nos eventos envolvidos na iniciação, estimulação, invasão e metástase do câncer. No processo inflamatório crônico, citocinas como TNF- α e IL-6 induzem a geração de radicais livres que danificam o DNA causando mutações que permitem a iniciação do tumor.

Os níveis de diversas citocinas séricas têm sido estudados em relação ao processo de desenvolvimento do CG e como possibilidade de auxílio diagnóstico em lesões malignas. Descobriu-se que os níveis de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 e IL-18 estão significativamente elevados localmente no estômago dos pacientes infectados com *H. pylori*, em contraste com os seus controles não infectados (Lindholm *et al.*, 1998). Além disso, foi relatado que os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IFN- γ – e em especial a IL-4 (Bednarz-Misa *et al.*, 2020) – podem prever a malignidade de uma lesão gástrica (Villagran *et al.*, 2021a).

O desenvolvimento do tumor também é favorecido por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação celular, reduzindo a apoptose, enquanto citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , contribuem para a imunoevasão tumoral. As propriedades e as qualidades invasivas do tumor têm sido relacionadas ao fator necrose tumoral (TNF). O fator transformador fator de crescimento beta TGF β

favorece a transição de epitélio mesenquimal e outras citocinas, como o TNF- α e a IL-6, e desempenha um papel importante na angiogênese e na metástase. Nesse contexto, foi proposta a utilização da determinação sérica de citocinas como IL-6 e IL-10 como marcadores diagnósticos, embora os autores sugiram que é necessária a realização de estudo com maior número de casos (Villagran *et al.*, 2021a).

2.10 O papel da calprotectina na avaliação da inflamação intestinal

A calprotectina é um heterodímero de 36,5 kDa que se liga ao cálcio e ao zinco e pertence à família S100, cujo complexo proteico é composto por duas regiões hidrofóbicas S100A8 / A9 não ligadas covalentemente (Hessels *et al.*, 2012).

Está presente na superfície de monócitos e de macrófagos e facilita seu recrutamento para o local da inflamação. Sua síntese é aumentada durante o processo inflamatório. Ela também fornece um papel imunorregulatório intestinal pela interação com as metaloproteinases dependentes de zinco, responsáveis pela ativação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α no intestino. Sua excreção fecal está altamente correlacionada à do exame de leucócitos radiomarcados com ¹¹¹Índio, o padrão ouro para medir a gravidade da inflamação gastrointestinal (Hessels *et al.*, 2012; Røseth; Schmidt; Fagerhol, 1999).

3 JUSTIFICATIVA

A microbiota humana é composta por comunidades complexas de trilhões de microrganismos que vivem com os seres humanos. Esses microrganismos comensais coevoluíram com os seres humanos e beneficiaram a saúde humana, incluindo a utilização de nutrientes inacessíveis da dieta, a manutenção da integridade das barreiras da mucosa e contribuição para o desenvolvimento do sistema imunológico e a homeostase orgânica.

O entendimento do microbioma cresceu exponencialmente com o desenvolvimento de abordagens de sequenciamento de alto rendimento.

A modificação da microbiota intestinal, chamada então de *dísbiose*, tem implicado em uma série de doenças, incluindo gastrointestinais, autoimunes, neurológicas e metabólicas, além de câncer. Para este, infecções bacterianas e virais específicas também foram implicadas na carcinogênese e associadas com toxicidade relacionada ao tratamento e à terapia dessa doença.

A modificação da estrutura do tubo digestivo mediante uma excisão cirúrgica por câncer pode gerar impactos nessa microbiota comensal de modo que desfavorece assim os indivíduos submetidos a tal intervenção e afeta seu estado nutricional e imunológico. O reconhecimento tanto da microbiota normal, quanto da patológica, bem como o impacto que a cirurgia impõe a ela, é de suma necessidade, pois, além de ser um dado desconhecido na população, pode indicar um perfil (assinatura microbiana), que pode no futuro embasar condutas de modulação imune-intestinal com o intuito de melhorar a qualidade de vida de pacientes com câncer e até desfechos clínicos pós-cirúrgicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito do uso de probióticos pós-operatórios no estado clínico-nutricional e imunológico de pacientes gastrectomizados por câncer gástrico.

4.2 Objetivos específicos

GRUPO 1- Analisar e correlacionar o perfil metagenômico da microbiota intestinal usando sequenciamento do gene 16s rRNA, o estado nutricional, o perfil imunológico (citocinas inflamatórias), antes e após as gastrectomias de pacientes que fizeram ingestão de cápsulas de probióticos, bem como correlacionar os desfechos clínicos no período pós-operatório.

GRUPO 2- Analisar e correlacionar o perfil metagenômico da microbiota intestinal usando sequenciamento do gene 16s rRNA, o estado nutricional, o perfil imunológico (citocinas inflamatórias), antes e após as gastrectomias de pacientes que receberam orientações nutricionais protocolares do SND, bem como correlacionar os desfechos clínicos no período pós-operatório.

GRUPO 3- Analisar o perfil metagenômico da microbiota intestinal usando sequenciamento do gene 16s rRNA, o estado nutricional, o perfil imunológico (citocinas inflamatórias) e diagnóstico de *H. pylori* por EDA (endoscopia digestiva alta) de pessoas saudáveis (funcionários de nível médio da FCECON) usando probióticos conforme protocolo do estudo.

GRUPO 4- Analisar e correlacionar os desfechos clínicos, tais como deiscência de sutura; ocorrência de fístulas; infecção de ferida operatória; tempo de internação; mudança do protocolo de antibioticoterapia; óbito, com o uso de probióticos em pacientes gastrectomizados por câncer.

GRUPO 5- Analisar e correlacionar os desfechos clínicos, tais como deiscência de sutura; ocorrência de fístulas; infecção de ferida operatória; tempo de internação; mudança do protocolo de antibioticoterapia; óbito, com o uso de placebo (carbonato de cálcio 0,5g) em pacientes gastrectomizados por câncer.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

O presente projeto consistiu em um estudo clínico randomizado controlado.

5.2 População do estudo

A população do estudo foi constituída de pacientes de todos os gêneros, com idade a partir de 18 anos, candidatos a gastrectomias totais ou parciais, eletivas e controle negativo. Foram designados para cinco grupos, sendo um grupo intervenção (G1) N=12 e um grupo controle convencional (G2) N=12; um grupo G3 (N=12), com participantes saudáveis; e por último dois grupos G4 e G5 (N=64), dos quais foram avaliados apenas os desfechos clínicos.

No grupo 1 a intervenção se deu com ingestão de probióticos desde o 1.º dia pós-operatório na liberação da dieta (via oral ou TNE) até sete dias no pós-operatório. O grupo G2 seguiu com dieta de rotina do serviço de nutrição e dietética (SND). O grupo G3 (funcionários da FCECON) fez a ingestão de probióticos por sete dias durante o seguimento, sem intervenção cirúrgica; estes foram escolhidos aleatoriamente e padronizados por nível social pareados com o G1. Nos grupos G4 (intervenção) e G5 (placebo), o G4 fez gastrectomia e usou probióticos por sete dias; e o G5 fez gastrectomia e foi seguido ao longo de sete dias com uso de cápsula placebo (carbonato de cálcio) para que se pudesse avaliar apenas os desfechos clínicos, que são classificados por Clavien-Dindo conforme o **Quadro 6**. Nesses grupos não se avaliou a microbiota e o perfil citocínico. Eles foram escolhidos por randomização por meio de aplicativo específico e padronizados por nível social pareados com o G1 (**Figura 10**).

Em ambos os grupos (G1 e G2), foi realizada coleta de fezes antes da cirurgia em nível ambulatorial; e, após os sete dias de seguimento, já no G3, foram coletadas fezes e foi realizada uma coleta de sangue para testar sorologia para *H. pylori*, antes da intervenção com probiótico e após sete dias de ingestão, para descartar um possível diagnóstico de *H. pylori*, o que reduziria assim o risco de viés de alteração da microbiota desses grupos; caso o resultado viesse a ser positivo, o paciente seria

conduzido para o tratamento por médico especializado na FCECON. O grupo G1 foi comparado com os grupos G4 e G5 de forma que se avaliaram os desfechos clínicos* relacionados à intervenção com e sem probióticos.

5.3 Cálculo amostral

Para a primeira etapa da pesquisa, foi calculado o N levando em consideração o índice de Shannon, o qual representa a diversidade ecológica da microbiota intestinal, que, em pacientes com câncer gástrico, é estimada em 2,4, enquanto, em pacientes saudáveis, esse índice é de 3,0 (Liang *et al.*, 2019). Utilizando o aplicativo G-Power, encontra-se que é necessário um mínimo de 12 indivíduos em cada grupo (G1, G2, G3) de comparação entre grupos avaliados para análise de microbiota intestinal para se obter um poder de estudo superior a 80% e p-alfa de 0,05. Totalizando o N amostral com **36 participantes** (com margem de 20% de perdas), apenas os grupos G1, G2 e G3 foram compreendidos nesse cálculo (**Figura 8**).

Esse cálculo foi feito a partir da seguinte função:

G.Power.t.test (n = 2:20, delta = 3.0 - 2.4, sd = sqrt(0.1))

Para a segunda etapa da pesquisa, usou-se uma fórmula para populações finitas de gastrectomizados na FCECON. Com base na estatística de que anualmente cerca de 270 gastrectomias por câncer são propostas, das quais cerca de 90 são paliadas por progressão de doença ao longo do seguimento pré-operatório, foi viabilizado um segundo cálculo para o recrutamento do número de participantes necessários para responder aos objetivos da presente pesquisa sobre desfechos clínicos.

Levando em consideração as cirurgias paliadas, as remarcações e outras variáveis, chegou-se ao número ajustado real de 180 gastrectomias por ano em média; os participantes pertencentes ao G4 e G5 foram calculados pelo cálculo de amostra finita conforme fórmula abaixo:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde:

- n – Amostra calculada;
- N – População;
- Z – Variável normalmente padronizada associada ao nível de confiança;
- p – Verdadeira probabilidade do evento;
- e – Erro amostral.

Considera-se o nível de confiança de 95%; e o erro amostral de 5%. Assim, o tamanho da amostra nesses grupos é de **64 pacientes**, dos quais 32 para G4; e 32 para G5 para o tempo restante de coleta até a conclusão do período de coleta de dados (**Figura 9**).

5.4 Local da coleta de dados

Os dados foram obtidos no setor de cirurgia oncológica da FCECON.

5.5 Critério de inclusão para os grupos G1, G2, G4 e G5

- Pacientes com indicação de gastrectomias totais ou parciais, com estadiamento TNM= T1, T2, T3, T4 (sem quimioterapia neoadjuvante);
- Pacientes com indicação de gastrectomias apenas por câncer;
- Idade a partir de 18 anos;
- Não usaram suplementos probióticos e prebióticos nos últimos 15 dias.
- Pacientes que não fizeram preparos mecânicos do cólon nos últimos 30 dias.
- Pacientes que não estejam imunossuprimidos.
- Pacientes que sejam residentes/domiciliados no Amazonas.

5.6 Critério de exclusão para os grupos G1, G2, G4 e G5

- Pacientes submetidos a cirurgias no cenário paliativo (sangramento ou obstrução).
- Pacientes que não consigam cumprir todas as etapas do seguimento.
- Pacientes que tenham como diagnóstico outras morbidades que alterem o metabolismo energético e a ingestão alimentar, como SIDA, DM, grávidas, doenças autoimunes, doenças hepáticas e renais, intolerantes à lactose, glúten, doenças inflamatórias intestinais, infecção vigente.
- Pacientes que tenham impossibilidade de realizar bioimpedância elétrica por possuírem MCP (marca-passo), edemas graves, grávidas, mulheres no período menstrual, placas de titânio em algum membro do corpo.
- Pacientes que por algum motivo tiveram suas cirurgias suspensas durante o seguimento.

5.7 Critério de inclusão para o grupo G3 (controle negativo-saudável)

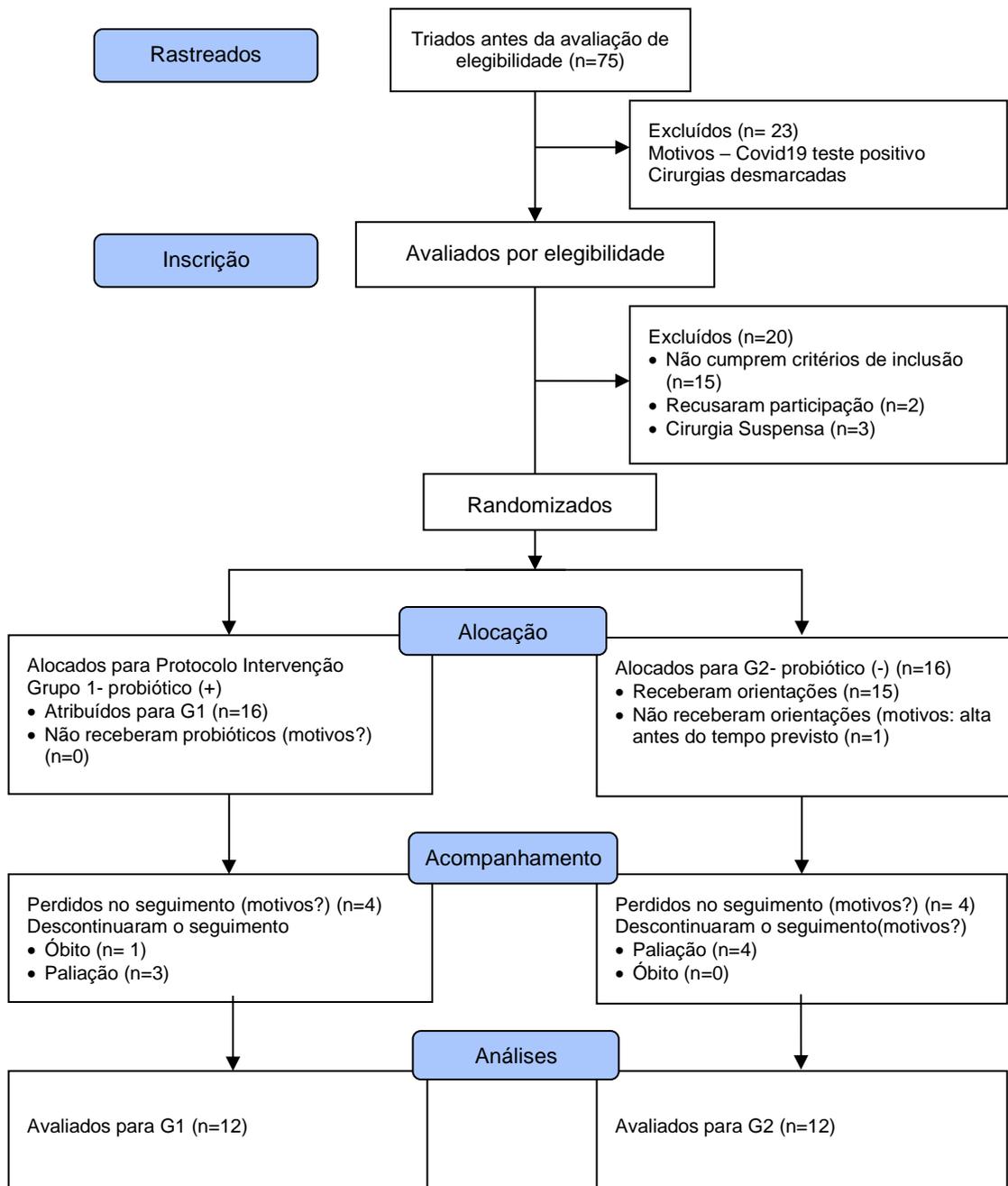
- Pessoas que não tenham história familiar de câncer gástrico.
- Pessoas que não sejam de tipagem sanguínea A+ (Mizrahi *et al.*, 2015).
- Pessoas sem comorbidades conhecidas.
- Idade a partir de 18 anos.
- Pessoas do mesmo nível socioeconômico (nível médio) dos pacientes do grupo G1.
- Pacientes que não usaram probióticos e prebióticos nos últimos 15 dias.
- Pacientes que não usaram antibióticos 15 dias antes do início da etapa 1 do estudo.
- Pessoas que não tenham possibilidade de realizar bioimpedância elétrica por possuírem MCP (marca-passo), edemas, grávidas, mulheres no período menstrual, placas de titânio em algum membro do corpo.

5.8 Critério de exclusão para o grupo G3 (controle negativo-saudável)

- Pessoas que não consigam cumprir todas as etapas do seguimento.

5.9 Fluxograma de recrutamento – Primeiro tempo do estudo

Figura 8 – Delineamento experimental nutricional por protocolo convencional (PC) e grupo intervenção segundo fluxograma CONSORT (Eldridge *et al.*, 2016).

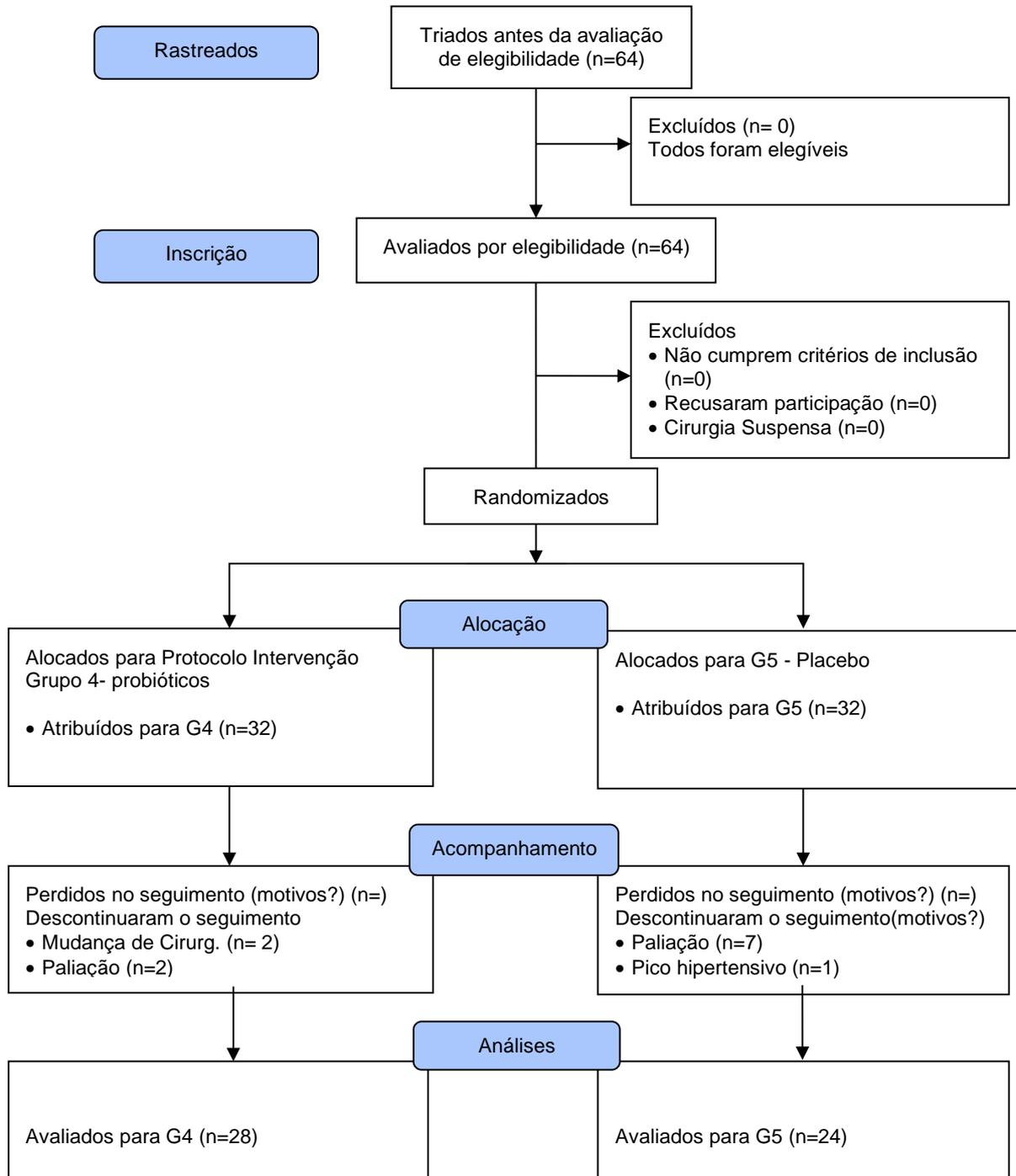


Nota: N= Variável numérica refere-se ao total de indivíduos nas subamostras obtidas durante o *follow up*.

Fonte: O autor.

5.9.1 Fluxograma de recrutamento – Segundo tempo do estudo (desfechos clínicos)

Figura 9 – Delineamento experimental para teste de intervenção *versus* placebo na redução de complicações cirúrgicas no pós-operatório segundo fluxograma CONSORT (Eldridge *et al.*, 2016).



Nota: N= Variável numérica refere-se ao total de indivíduos nas subamostras obtidas durante o seguimento *follow up*.

Fonte: O autor

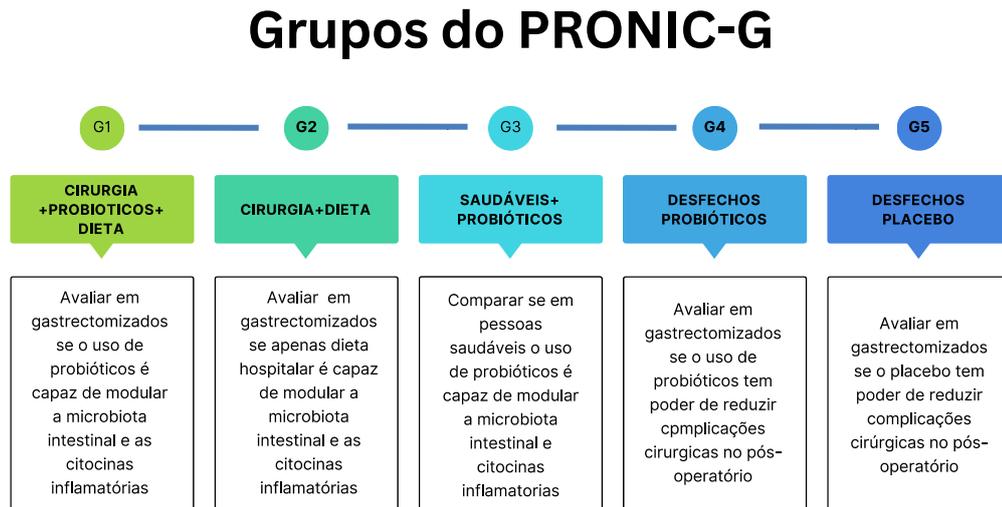
5.10 Fases operacionais da pesquisa

5.10.1 Recrutamento e randomização

Para o primeiro tempo da pesquisa na etapa (E1), foram convidados pacientes elegíveis para gastrectomias por câncer na FCECON em âmbito ambulatorial ou por meio do mapa cirúrgico no dia da internação. A randomização se deu por meio de aplicativo específico chamado Randomizer® for Clinical Trial Lite. Foram designadas, para cada grupo, enfermarias diferentes para evitar contato entre os participantes da pesquisa (G1 intervenção e G2 não intervenção). Para o grupo G3 (controle), os participantes foram recrutados por convite, os quais eram funcionários da FCECON – este grupo especificamente foi pareado pelo nível socioeconômico dos pacientes do grupo G1. No segundo tempo da pesquisa, na etapa (E2), os grupos G4 e G5 foram recrutados e randomizados após término da coleta dos grupos G1 e G2 para análise de desfechos clínicos no pós-operatório em sete dias, conforme detalhado na **Figura 10**.

Os pacientes foram abordados no ambulatório de nutrição e no momento da internação, após o teste de covid-19 (negativo), de modo que foi perguntado se desejavam participar da pesquisa; caso cada paciente concordasse, a equipe o conduziria a um consultório disponibilizado no ambulatório para a aplicação individual do TCLE; e ainda nesse ato foram informados detalhes sobre como e onde seria a coleta de dados durante o seguimento da pesquisa.

Figura 10 – Grupos de estudo conforme resposta por objetivo específico



Fonte: O autor

5.10.2 Estágios operacionais da pesquisa – grupo intervenção G1

Estágio 1: Ambulatório ou Internação (24 horas) – 1.º Pré-OP.

Foram obtidas informações gerais para a avaliação nutricional física, aplicação de questionário socioeconômico, aferição de peso, altura, circunferência do braço (CB), circunferência muscular do braço (CMB) e dobra cutânea do tríceps (DCT) e Músculo Adutor do Polegar – MAP na mão dominante (Flood *et al.*, 2014) (conforme apêndice E) e avaliação de bioimpedância elétrica (conforme apêndice G).

Estágio 2: Fase pré-operatória – 1.º Pré-OP.

Foi aferido registro de dados laboratoriais do prontuário do paciente, solicitados pelo médico assistente, no período pré-operatório, além de amostra de sangue para hemograma, citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL1 β , IL-10, INF- γ), calprotectina fecal, albumina e aplicação de ficha recordatória alimentar 24h; nesse estágio também foi realizada a coleta fecal com coletor de uso próprio para sequenciamento do microbioma intestinal (alguns pacientes foram captados no ambulatório de nutrição, na consulta pré-operatória).

Estágio 3: Fase pós-operatória – 7.º DPO (período igual a sete dias a partir do 1.º DPO na enfermaria).

Nesse momento o paciente foi orientado a iniciar a ingestão no 1.º Pós-OP de uma cápsula ao dia, sempre no mesmo turno, por sete dias, após liberação de dieta pelo cirurgião até o 7.º DPO já em âmbito da enfermaria.

Foi realizada verificação das complicações pós-operatórias (conforme Apêndice H, infecção, tempo de internação, mortalidade (Katayama *et al.*, 2016), aferição de peso, altura, CB, CMB e DCT e Músculo Adutor do Polegar – MAP na mão dominante (Flood *et al.*, 2014) (conforme apêndice E), avaliação de bioimpedância elétrica (conforme apêndice G); e no 7.º DPO também foi realizada nova coleta fecal para avaliação do microbioma intestinal, bem como novo exame bioquímico de hemograma, leucograma, linfócitos totais e dosagem de IL-6, TNF- α , IL1 β , IL-10, INF- γ e calprotectina fecal.

5.10.3 Estágios operacionais da pesquisa – grupo controle G2

Estágio 1: Ambulatório ou internação (24 horas) – 1.º Pré-OP.

Foram obtidas informações gerais para início da avaliação nutricional física, aplicação de questionário socioeconômico, aferição de peso, altura, CB, CMB e DCT e Músculo Adutor do Polegar – MAP na mão dominante (Flood *et al.*, 2014) (conforme apêndice E) e avaliação de bioimpedância elétrica (conforme apêndice G).

Estágio 2: Fase pré-operatória – 1.º Pré-OP.

Foi realizado levantamento de dados de prontuário e orientações nutricionais protocolar do SND.

Foram coletados registros de dados laboratoriais do prontuário do paciente, solicitados pelo médico assistente, no período pré-operatório, além de hemograma, leucograma, linfócitos totais, proteínas totais e aplicação de ficha recordatória 24h; nesse estágio também foi realizada a coleta fecal para sequenciamento do microbioma intestinal. Ainda nesse momento, após coleta de fezes para análise, o(a) participante recebeu orientação nutricional protocolar do serviço de nutrição sobre como deveria ser sua alimentação durante seu pós-operatório e quais eram os alimentos mais indicados para recuperação geral do seu estado nutricional, tendo sido repetidas as orientações no 7.º DPO, antes da alta hospitalar.

Estágio 3: Fase pós-operatória – 7.º DPO (período igual a sete dias a partir do 1.º DPO).

Foi realizada a verificação das complicações pós-operatórias (conforme Apêndice H), infecção, tempo de internação, mortalidade (Katayama *et al.*, 2016), aferição de peso, altura, CB, CMB e DCT e Músculo Adutor do Polegar – MAP na mão dominante (Flood *et al.*, 2014), (conforme apêndice E), avaliação de bioimpedância elétrica (conforme apêndice G); e nesse estágio também foi realizada a coleta fecal para sequenciamento do microbioma intestinal, bem como novo exame bioquímico de hemograma, leucograma, linfócitos totais e dosagem de IL-6, TNF- α , IL1 β , IL-10, INF- γ , calprotectina fecal e albumina.

5.10.4 Estágios operacionais da pesquisa – grupo controle negativo G3

Foram obtidas informações gerais para início da avaliação nutricional física, aplicação de questionário socioeconômico, aferição de peso, altura, CB, CMB e DCT e Músculo Adutor do Polegar – MAP na mão dominante (Flood *et al.*, 2014) (conforme apêndice E) e avaliação de bioimpedância elétrica (conforme apêndice G); foi realizada uma coleta de sangue para sorologia de *H. pylori* a fim de descartar um possível diagnóstico de *H. pylori*, reduzindo assim o risco de viés de alteração da microbiota dos pacientes; caso o paciente viesse a ter diagnóstico positivo, seria conduzido para o tratamento por médico especializado na FCECON.

Ainda no mesmo momento, após coleta de fezes para análise, o(a) participante recebeu o produto com probióticos para iniciar a modulação intestinal, com a ingestão de uma cápsula ao dia, sempre no mesmo turno, por sete dias, conforme protocolo de teste, sendo reavaliada a coleta de fezes para novo sequenciamento após sete dias do início da intervenção.

5.10.5 Estágios operacionais da pesquisa – grupo desfechos clínicos G4 e G5

Para avaliar os desfechos clínicos – que são deiscência de sutura; ocorrência de fístulas; infecção de ferida operatória; tempo de internação; mudança do protocolo de antibioticoterapia e o óbito – e correlacioná-los, foram obtidas informações gerais para início da avaliação nutricional física, aplicação de questionário socioeconômico, REC-24h para avaliar hábito alimentar, aferição de peso, altura, CB, CMB e DCT e

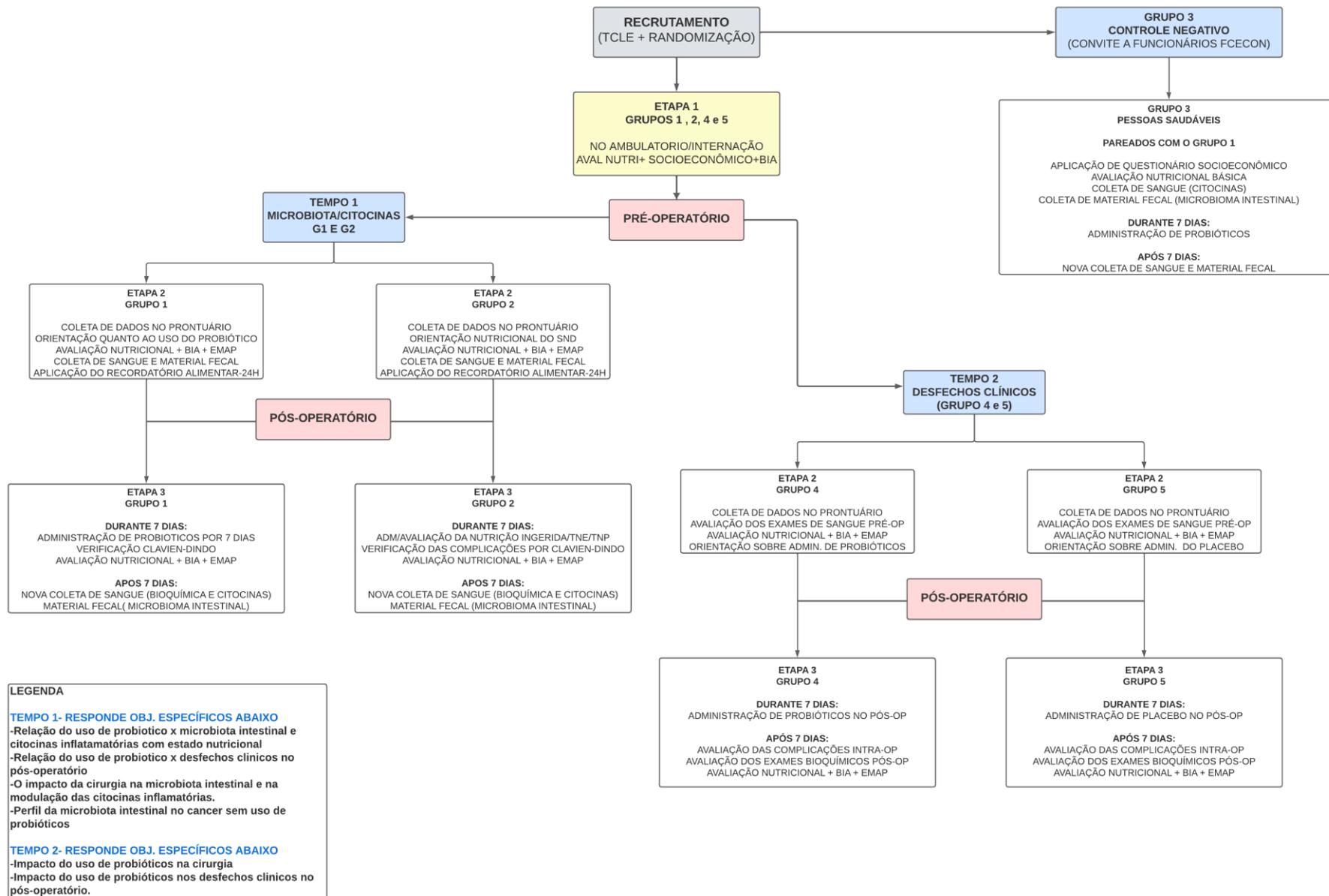
Músculo Adutor do Polegar – MAP na mão dominante (Flood *et al.*, 2014) (conforme apêndice E) e avaliação de bioimpedância elétrica para coleta apenas do Ângulo de Fase – AF (conforme apêndice G).

Ainda nesse momento, os participantes randomizados para o grupo intervenção (G4) receberam o produto com probióticos, conforme protocolo de teste, e o G5 recebeu o produto com placebo – todos os grupos de forma cegada.

5.10.6 Protocolo de teste

No primeiro tempo da pesquisa, nas etapas 2 e 3, os pacientes foram distribuídos aleatoriamente por aplicativo específico (Randomizer Clinical Trial Lite®) em cinco blocos (G1, G2, G3, G4 e G5), na proporção de 1:1, para receber uma cápsula ao dia com os probióticos (somente grupos G1, G3 e G4) com formulação contendo 20 bilhões de microrganismos: *Lactobacillus acidophilus* NCFM®, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37™, *Bifidobacterium lactis* Bi-04™, *Bifidobacterium lactis* Bi-07™, *Bifidobacterium bifidum* Bb-02™), associados a protocolo dietético padrão do SND. No grupo G2 (não intervenção), foi realizado tratamento convencional com protocolo de orientação nutricional padrão, sem uso de probióticos. O produto da intervenção (cápsulas de probióticos) foi distribuído e embalado de acordo com a randomização – esses códigos gerados não foram divulgados durante todo o período da pesquisa; os testes foram realizados em enfermarias alternadas conforme detalhado no recrutamento para não haver cruzamento de informações entre os participantes outrora cegados por grupo. No caso do grupo G3 (controle saudável), os participantes receberam as cápsulas de probióticos após o término das coletas dos grupos G1 e G2. Ambos os grupos que usaram cápsulas de probióticos, sendo uma cápsula ao dia, sempre no mesmo turno, seguiram com a sua utilização por sete dias. Os grupos foram monitorados duas vezes por dia, presencialmente ou por telefone, a fim de evitar perda da ingestão das cápsulas. Os grupos G4 e G5 configuraram o segundo tempo da pesquisa, sendo o G4 aquele que fazia uso de probióticos seguindo padrão do G1, e o G5 usaria cápsulas de placebo com carbonato de cálcio a 0,5g para testar o poder da intervenção em reduzir complicações cirúrgicas no pós-operatório (Figura 11).

Figura 11 – Fluxograma de etapas da pesquisa



5.10.7 Variáveis de avaliação clínica e do estado nutricional

a) Variáveis demográficas

Gênero, data de entrada, data de nascimento, idade, procedência, residência e história familiar de câncer (conforme apêndice C).

b) Variáveis clínicas na admissão

Índice Massa Corporal – IMC (kg/m²) foi calculado e analisado segundo o sexo utilizando-se o peso e a estatura corporal estimados quando essas medidas não pudessem ser obtidas por aferição. Apesar de bastante criticado pelo fato de não refletir a realidade da composição corporal, ele dá um norte sobre isso. Os pontos de corte adotados do IMC (Cole; Freeman; Preece, 1995) incluem a classificação de desnutrição com três classes (desnutrição grau I, grau II e grau III).

Por meio do Músculo Adutor do Polegar – MAP, foram avaliadas as medidas de dobras do músculo adutor da mão direita, que foram realizadas aplicando-se o adipômetro no lado dominante da mão, entre o dedo polegar e o indicador, tomando a medida da musculatura, isenta de gordura (Flood *et al.*, 2014).

Avaliou-se a condição de reservas da área muscular do braço e a circunferência muscular desse membro (foi utilizada fórmula de predição para cálculo dessas reservas proteicas, além de sua área adiposa (Paz *et al.*, 2020)).

Quanto às medidas de circunferências, foi avaliada apenas a circunferência braquial (CB) posicionada no ponto médio entre o acrômio e o olécrano e os procedimentos de tomadas das dobras cutâneas (Fragas, 2015).

Para a contagem total de linfócitos periféricos – CTLP, foram utilizados os exames de leucócitos totais obtidos a partir do hemograma e o percentual de linfócitos obtidos da análise de rotina. A CTLP foi estimada conforme fórmula de predição da Equação 1 a seguir:

$$\text{EQUAÇÃO 1} = \text{CTLP} = \text{Percentual de linfócitos totais} \times \text{Leucócitos totais} \div 100$$

Os resultados obtidos foram aplicados na avaliação nutricional instantânea, que utiliza dois parâmetros de classificação para desnutrição grave, CTLP e albumina sérica $<3,5\text{mg/dL}$; na análise foi utilizado o primeiro parâmetro (Contagem Total de Linfócitos Periféricos $<1500\text{ mm}^3$) (Veterans Affairs Total Parenteral Nutrition Cooperative Study Group, 1991).

c) Avaliação da ingestão alimentar

No momento da internação, no 1.º pré-operatório imediato, os indivíduos foram questionados quanto à sua ingestão alimentar habitual usando recordatório 24h. A quantificação da ingestão diária dos nutrientes foi feita utilizando-se o *software* AVANUTRI (versão 4.0, Avanutri & Nutrição Serviços e Informática LTDA ME, Rio de Janeiro, Brasil). Os valores de ingestão de macro e de micronutrientes foram expressos em valores absolutos.

d) Variável biofísica

Medida de Bioimpedância Elétrica (BIA) com ângulo de fase

A BIA foi realizada utilizando-se um Plestimógrafo Unifrequencial, de marca Biodynamics BIA 450, para a avaliação da composição corporal e o estado nutricional (Barbosa-Silva *et al.*, 2003; Cox-Reijven; Van Kreel; Soeters, 2003; Sarhill *et al.*, 2003). Foi realizada aferição no 1.º dia pré-operatório e no 7.º DPO (dia pós-operatório).

e) Variáveis antropométricas

- Peso

O peso corporal atual foi obtido utilizando balança plataforma da marca BALMAK® com capacidade para 180kg. A mensuração do peso corporal atual foi realizada conforme a técnica proposta por (Antonio Cláudio Goulart Duarte, 2007).

- Percentual de perda de peso (%PP)

O percentual de perda de peso (%PP) relaciona a mudança do peso em um determinado período de tempo; tal relação foi avaliada a partir da seguinte equação (Barbosa-Silva *et al.*, 2003). **(Quadros 2 e 3)**

Quadro 2 – Significado da perda de peso em relação ao tempo

Tempo	Perda de Peso Significativa (%)	Perda de Peso Grave (%)
1 semana	1 a 2	>2
1 mês	5	>5
3 meses	7,5	>7,5
6 meses	10	>10

Fonte: BLACKBURN; BRISTAIN (1997) adaptado de TIRAPEGUI; RIBEIRO (2009)

Quadro 3 – Classificação do estado nutricional de acordo com adequação do peso

Adequação do peso (%)	Estado nutricional
< 70,0	Desnutrição grave
70,1 a 80	Desnutrição moderada
80,1 a 90	Desnutrição leve
90,1 a 110	Eutrofia
110,1 a 120	Sobrepeso
> 120	Obesidade

Fonte: (Blackburn; Thornton, 1979)

- Estatura

Para mensurar a estatura, foi utilizado o estadiômetro portátil de altura da marca TBW®, com escala de 0 a 213 cm/0,1 cm. O paciente foi orientado a se posicionar em pé, centralizado na base da balança, descalço, com membros superiores estendidos ao longo do corpo, utilizando a vestimenta do hospital, sem adornos, chapéus ou bonés (Fontanive, R., De Paula, T. P., Peres, W. A., & Duarte, A. C., 2007).

- Circunferência do braço (CB)

$$\% \text{ PP} = \frac{(\text{Peso habitual} - \text{Peso atual})}{\text{Peso habitual}} \times 100$$

A circunferência do braço (CB) é a combinação da medida do osso, músculo e gordura subcutânea. Embora possa ser considerada medida independente, frequentemente é combinada com a Dobra Cutânea Tricipital (DCT) para o cálculo da Circunferência Muscular do Braço (CMB) e da Área Muscular do Braço (AMB) (Fontanive, R., De Paula, T. P., Peres, W. A., & Duarte, A. C., 2007).

A circunferência do braço foi obtida utilizando-se a fita métrica da marca Sanny® com precisão de 1mm. Durante a medida, o paciente foi posicionado em pé ou sentado com o braço dominante relaxado na lateral do corpo e com a palma da mão voltada para a coxa. Utilizando como critério de dominância a escrita (Fontanive, R., De Paula, T. P., Peres, W. A., & Duarte, A. C., 2007), o valor encontrado foi confrontado com os valores de referência estabelecidos por (Frisancho, 1981) segundo os gêneros e a idade, conforme o **Quadro 4**.

Quadro 4 – Percentis de circunferência do braço (cm) para ambos os gêneros

Idade	Masculino	Feminino
18-24,9	30,7	26,8
25-29,9	31,8	27,6
30-34,9	32,5	28,6
35-39,9	32,9	29,4
40-44,9	32,8	29,7
45-49,9	32,6	30,1
50-54,9	32,3	30,6
55-59,9	32,3	30,9
60-64,9	32	30,8
65-69,9	31,1	30,5
70-74,9	30,7	30,3

Fonte: (Frisancho, 1981)

A adequação da CB foi determinada por meio da equação abaixo, e o estado nutricional foi classificado de acordo com o **Quadro 5**.

$$\text{- Adequação da CB (\%)} = \frac{\text{CB obtida (cm)} \times 100}{\text{CB percentil 50}}$$

Quadro 5 – Estado nutricional segundo a circunferência do braço

	Desnutrição grave	Desnutrição moderada	Desnutrição leve	Eutrofia	Sobrepeso	Obesidade
CB	<70%	70 a 80%	80 a 90%	90 a 110%	110 a 120%	>120%

Fonte: BLACKBURN; THORNTON (1979)

A adequação avalia a reserva de tecido muscular sem correção da massa óssea. É obtida a partir dos valores da circunferência do braço (CB) e da dobra cutânea tricipital (DCT) (Silva, Flávia Moraes, 2021).

A CMB é calculada pela fórmula abaixo estabelecida por Frisancho (1981):

$$\text{CMB (cm)} = \text{CB} - (3,14 \times \text{PCT} \div 10)$$

Onde, CMB = Circunferência muscular do braço em cm;

CB = Circunferência braquial em cm;

PT = Prega tricipital em cm.

A adequação da CMB foi determinada por meio da equação abaixo, e a classificação do estado nutricional foi realizada de acordo com a **Tabela 1**.

$$\text{Adequação da CMB (\%)} = \frac{\text{CMB obtida (cm)} \times 100}{\text{CMB percentil 50}}$$

Tabela 1 – Adequação da CMB para classificação do estado nutricional

<i>Adequação da CMB (%)</i>	<i>Estado nutricional</i>
< 70	Desnutrição grave
70 a 80	Desnutrição moderada
80 a 90	Desnutrição leve
90	Eutrofia

Fonte: Frisancho (1981)

5.11 Análise inflamatória

As principais citocinas que influenciam na resposta de fase aguda em pacientes oncológicos são interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 10-IL-10, interferon gama-INF- γ (Gulen *et al.*, 2012; O’Riordain *et al.*, 1999), além da utilização da calprotectina como marcador da inflamação intestinal (Røseth; Schmidt; Fagerhol, 1999). As amostras de citocinas foram transportadas em depósito com isolamento térmico apropriado ao laboratório de biologia molecular na FCECON, inicialmente por 30 dias em *freezer* -20°C, para posteriormente serem transportadas em caixa térmica com gelox e serem armazenadas em *freezer* a -80°C na FHEMOAM, local onde foram realizadas as análises de citocinas.

5.12 Avaliação das citocinas CXCL-8, IL-1B, IL-6, TNF-A, IL-12P70, IL-2, INF-Y, IL-17A, IL-4, IL-10

O perfil imunológico (citocinas inflamatórias) foi medido utilizando o citômetro (FACSCantoll, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), com o *kit* cytometric bead array (CBA), BD™ Human Chemokine and BD Human Cytokine Th1/Th2/Th17 e citocinas inflamatórias (CXCL-8, IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-12p70, IL-2, INF-y, IL-17a, IL-4, IL-10), antes e após as gastrectomias (Sánchez-Zauco *et al.*, 2017) (o protocolo de quantificação das citocinas pelo método CBA segue descrito no Apêndice L).

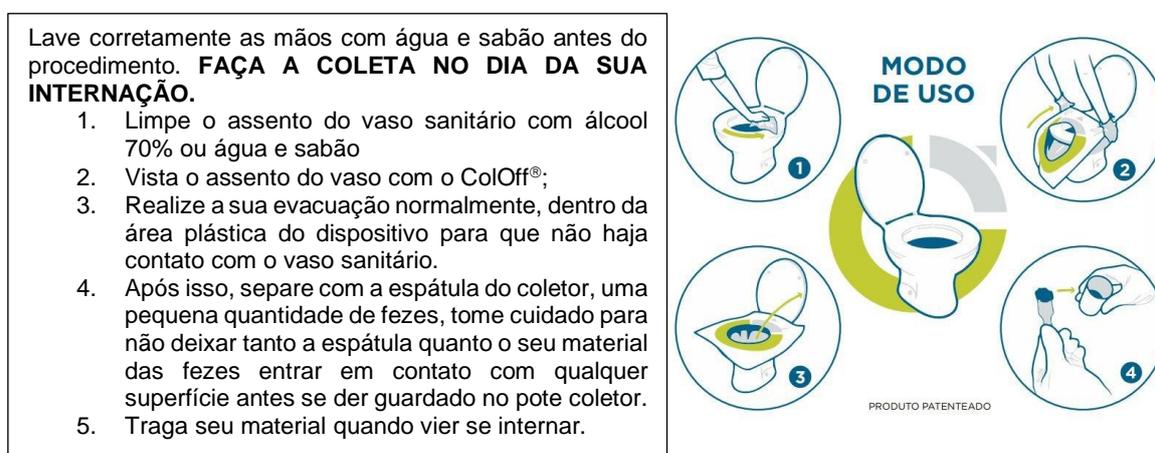
5.13 Sequenciamento metagenômico do gene 16s rRNA

5.13.1 Métodos para o grupo 1 – probiótico (+) e grupo 2 – probiótico (-)

5.13.1.1 Coleta de fezes

A orientação de coleta de fezes se deu após a consulta de pré-operatório e a aplicação do TCLE, em âmbito ambulatorial; o paciente, nesse ato, foi orientado a como deveria ser realizada a coleta seguindo o passo a passo abaixo e utilizando-se de um dispositivo apropriado, chamado ColOff® (**Figura 12**).

Figura 12 – Dispositivo coletor ColOff®



Fonte: Coloff (2021)

Para padronização dos métodos subsequentes à coleta, foram utilizadas amostras de fezes de pessoas incluídas na pesquisa conforme critérios de inclusão. Uma pequena amostra de fezes frescas (1 a 2g) foi coletada e armazenada em coletores comerciais (NEOPROSPECTA) até a data do processamento (estável de 1-30 dias em temperatura ambiente), conforme protocolo do laboratório que faria as análises (Neoprospecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil).

5.13.1.2 Extração e purificação de DNA e RNA fecal

Para extração dos ácidos nucleicos das amostras de material fecal, foi utilizado o equipamento *PreceLLys* (Bertin Technologies, França) para homogeneização do material, seguida da extração utilizando o *kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit* de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, EUA), tendo sido isolados simultaneamente tanto o DNA quanto o RNA. Após as extrações, todas as amostras foram quantificadas por meio do equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C; e as de RNA, a -80°C até o momento do uso.

5.13.2 Avaliação qualitativa e quantitativa do DNA

Para análise qualitativa do DNA extraído, foi empregada eletroforese em gel de agarose 1% submerso em tampão TAE 1x (diluído 50x do estoque: Tris-HCl 4 M, ácido acético glacial 11,4% v/v, EDTA 0,1 M) a 6,7 V/cm de gel por 16 minutos. As soluções de corrida consistiram em 1µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25%, xileno cianol FF, 30% de glicerol em água), 2µL de GelRed® (Biotium) 1:500 e 3µL de amostra de DNA. A posição das bandas foi comparada com eletroforese de λ-PstI visando moléculas de peso superior a 11500pb.

As amostras de DNA e os produtos de PCR foram quantificados por fluorimetria utilizando o aparelho Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific) com *kit* Qubit™ dsDNA HS (Invitrogen, Q32851) seguindo o protocolo do fabricante. Sucintamente, diluiu-se volume suficiente do reagente Qubit™ dsDNA HS a 1:200 em tampão do *kit* (solução de trabalho) para os dois padrões e as amostras. Os padrões mínimo e máximo foram preparados com 190µL de solução de trabalho mais 10µL de padrão, enquanto as soluções de DNA foram compostas de 198µL de solução de trabalho e 2µL de DNA. As soluções foram agitadas em vórtex por três segundos e incubadas na bancada por dois minutos antes da aferição. A concentração da solução de estoque foi calculada pelo próprio aparelho de acordo com a fórmula seguinte (C = concentração de estoque em ng/µL; QF = concentração da solução Qubit em ng/mL) e expressa em ng/µL. $C = QF * 10^{-1}$.

5.13.2.1 Investigação de bactérias da microbiota por avaliação do gene 16s do RNA

5.13.2.1.1 Amplificação do gene-alvo (16s rRNA) e sequenciamento

Foi enviado para a empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) – responsável pela construção das bibliotecas e sequenciamento – o material fecal a fim de avaliar a composição bacteriana dos pacientes; as regiões V3-V4 do gene 16s do RNA ribossomal (rRNA) foram amplificadas por PCR convencional e sequenciadas. Para isso, foram utilizados 50ng de DNA molde, conforme padronização do laboratório.

Quando uma amostra não era amplificada, na PCR seguinte era testado o dobro e a metade da massa a fim de verificar se a não amplificação era devido à insuficiência de DNA bacteriano na amostra ou à presença de inibidores na reação.

Os iniciadores utilizados nas ampliações possuem adaptadores para sequenciamento na plataforma *Illumina* e geram amplicons de tamanho médio de 510 pares de bases (iniciadores sublinhados e sequências complementares ao gene bacteriano em negrito, U341F:

5'CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT**CCTACGGGRSGCAGCAG-3'** e 806R:5'GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT**GGACTACHVGGGTW TCTAAT-3'**).

A enzima *KAPA2G Robust HotStart ReadyMix* (KAPA Biosystems, Sigma Aldrich, EUA) foi utilizada para amplificação. Como controle positivo, utilizou-se DNA de *Escherichia coli*; e, para o negativo, água ultrapura (Sigma Aldrich).

Em seguida, os amplicons das amostras de material fecal foram purificados com *beads* magnéticas *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter, EUA), quantificados no *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a construção de cada biblioteca, uma nova amplificação foi realizada em triplicata utilizando-se 5ng de amplicon purificado por reação, enzima *Taq Platinum* (Invitrogen, EUA) e *barcodes* específicos para cada amostra (condições de amplificação: 95°C por 5min; seguidas de dez ciclos de 95°C por 45s, 66°C por 30s e 72°C por 45s, e uma extensão final de 72°C por 2min), segundo protocolo da empresa. As triplicatas foram reunidas e purificadas com *beads* magnéticas *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter, EUA) e, em seguida, foi feito o *pool* das bibliotecas utilizando-se volumes iguais de cada amostra.

A quantificação do *pool* foi feita por PCR quantitativo em tempo real com o *kit KAPA Library Quantification kit for Illumina platforms* (KAPA Biosystems, EUA). Para o sequenciamento, foi utilizado o *kit MiSeq Reagent V2 (500-cycles)* (Illumina, EUA), *paired-end* (300nt *read 1* e 210nt *read 2*) na plataforma *MiSeq* (Illumina, EUA), visando gerar ≥ 50.000 *reads* por amostra.

5.13.2.1.2 Processamento e filtragem das amostras sequenciadas

As sequências obtidas passaram por processamento no *pipeline* estruturado. O processamento consistiu em: 1) remoção dos adaptadores e iniciadores utilizando o Cutadapt (v.3.4); 2) remoção de *reads* mapeadas no genoma humano (GRCh37/h19 – BWA v.0.7.31); 3) importação das *reads* restantes para o programa *Quantitative insights into microbial ecology 2* (Qiime2 v.2020.8) (199); 4) filtro de qualidade (*phred score* > 10); 5) remoção de ruídos das *reads* por meio de Deblur (Amir *et al.*, 2017). Quando as sequências apresentavam pelo menos 97% de similaridade entre elas, foi realizada a clusterização como *Operational Taxonomic Units* (OTUs), seguida de busca de similaridade contra sequências presentes no banco de dados (Silva, v.132) visando à classificação taxonômica das OTUs. Por último, foram feitas curvas de saturação para avaliar se todas as amostras tinham saturado, ou seja, se toda a diversidade de sequências presente em cada amostra foi devidamente amostrada no sequenciamento e se poderia então seguir para a análise. Selecionaram-se aquelas com pelo menos 1.750 *reads* após aplicação dos filtros de qualidade e descartaram-se as OTUs que tiveram menos de três *reads* a fim de remover possíveis erros remanescentes do sequenciamento.

Análises de diversidade alfa (*Observed*, Chao1, Simpson e Shannon) e beta (*Bray-Curtis*, *unweighted* e *weighted* Unifrac) foram realizadas no pacote *phyloseq* (v.1.36.0) do RStudio (v.4.0.4; *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio Inc., Boston, MA, EUA). Adicionalmente, testes paramétricos/não paramétricos foram utilizados para avaliar a abundância diferencial nos índices alfa. A fim de calcular a diferença entre os índices de diversidade beta, foram utilizadas as análises de variância permutacional e o teste de dissimilaridade (PERMANOVA/ADONIS) no pacote *vegan* (v.2.5-7) do RStudio.

5.14 Calprotectina

O primeiro passo do processo analítico da calprotectina é extrair proteínas das fezes, cujas amostras devem ser homogeneizadas; fibras longas podem ser removidas para evitar distorções no processo de extração.

A técnica de referência é pesar fezes. No entanto o uso de um volume padronizado de tampão adicionado com uma quantidade calibrada delas é bastante comum. A etapa de extração é realizada usando um dispositivo, que varia de acordo com o fornecedor. O extrato do material é diluído e homogeneizado pelo uso prolongado de um vórtex. Dependendo da textura das fezes (normal, dura ou líquida), os protocolos podem variar. Particularmente para fezes líquidas, um volume padronizado de líquido pode ser diluído no tampão de extração. Uma centrifugação adicional pode ser obrigatória para sedimentar as partículas maiores na suspensão (Hart *et al.*, 2020).

5.15 Avaliação das complicações do tratamento cirúrgico

Clavien *et al.*, em 1992, lançaram uma proposta de classificação das complicações cirúrgicas, cuja terapia empregada no tratamento foi o ponto referencial para a diferenciação dos seus níveis de gravidade. Após 12 anos, Dindo *et al.*, em 2004, apresentaram uma versão aprimorada para classificação das complicações cirúrgicas, baseada na primeira proposta de (Clavien *et al.*, 2009; Mitropoulos *et al.*, 2018), numa escala de grau de 1 a 5 (**Quadro 6**).

Quadro 6 – Classificação das complicações cirúrgicas de Clavien-Dindo (CCD-BR)

Grau de Classificação	Definição
Grau I	- Qualquer desvio do curso pós-operatório Ideal sem necessidade de tratamento farmacológico ou de intervenções cirúrgicas, endoscópicas, e radiológicas - Regimes terapêuticos permitidos são: drogas antieméticas, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, eletrólitos, e fisioterapia. Esta categoria também inclui feridas operatórias drenadas à beira do leito
Grau II	- Requer tratamento farmacológico com drogas diferentes daquelas permitidas para complicações grau I - Transfusão sanguínea e nutrição parenteral total também estão incluídas
Grau III	Exige intervenção cirúrgica, endoscópica ou intervenção radiológica
	III a. Intervenção sem anestesia geral
	III b. Intervenção sob anestesia geral
Grau IV	Complicação com Risco de vida (incluindo SNC) * Necessidade de UTI
	IV a. Disfunção de um só órgão (incluindo diálise)
	IV b. Disfunção de múltiplos órgãos
Grau V	Morte do Paciente
Sufixo "d"	Se o paciente persiste com uma complicação no momento da alta o sufixo "d" (para "Deficiência") é adicionado para o respectivo grau de complicação. Esta marca indica a necessidade de seguimento futuro para avaliar completamente a complicação

**Hemorragia encefálica, AVC isquêmico, sangramento subaracnoideo, mas exclui acidentes isquêmicos transitórios.*

Traduzida e adaptada segundo metodologia divulgada por Beaton et al., em 2000. Instrumento fonte: Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. Ann Surg. 2004;240(2):205-13.

Fonte: (Dindo, 2014)

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Sabendo que as cirurgias dependem de alguns percalços no período perioperatório, tais como as intercorrências relacionadas à cirurgia como pico hipertensivo, sangramento maciço, hipotensão, ausência ao dia marcado para cirurgia, ausência de material médico-cirúrgico, óbitos, teste de covid-19 positivo, além de mudanças na conduta cirúrgica pelo fato de, no ato cirúrgico, a equipe cirúrgica observar progressão de doença para metastática a distância, considera-se uma limitação o não alcance do N amostral. Para prevenir tal fato, ajustaram-se as perdas para 20%.

7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética para realização da pesquisa com seres humanos, cumprindo todas as prerrogativas da Res. 466/12 do CNS e complementares. Foi aprovado com o CAAE: 35379220.0.0000.0004 e Número do Parecer: 4.360.676. Aprovado também pelos ensaios clínicos Clinical Trials.gov com NCT06250075, conforme **Anexo 1**.

8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados em planilha Excel e analisados com o *software* Statistical Package for the Social Sciences – SPSS, versão 21.0. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada com o Teste de Kolmogorov-Smirnov, sendo as variáveis simétricas descritas por média e desvio padrão; e as não paramétricas, por mediana e intervalo interquartil. Variáveis categóricas foram apresentadas na forma de valores absolutos e relativos. A comparação entre as medidas de cada grupo foi obtida com os testes T de Student e Mann-Whitney; e a associação entre as variáveis categóricas, com os testes Qui-Quadrado de Pearson e Exato de Fischer. Para a comparação entre os grupos, tempo e comportamento dos grupos ao longo do tempo, foi utilizado o modelo de Equações de Estimativa Generalizada e Post Hoc de Mínima Diferença Significativa. Foram consideradas significativas as análises com $P < 0,05$.

Quanto às análises estatísticas para a citometria, após a leitura no citômetro, os dados adquiridos foram encaminhados para análise no *software* FCAP Array com o apoio da FHEMOAM, a qual gerou a tabulação dos dados. Foi então realizada inspeção de *outliers* (*box-plot*) e de normalidade (teste Shapiro-wilk) nas distribuições das citocinas. Em virtude da presença de *outliers*, optou-se por realizar o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; e, posteriormente, comparações de grupos foram realizadas usando o procedimento de Dunn (1964) com uma correção de Bonferroni para comparações múltiplas das citocinas.

Quanto às análises estatísticas para avaliação da microbiota, as análises de diversidade alfa (*Observed*, Chao1, Simpson e Shannon) e beta (*Bray-Curtis*, *unweighted* e *weighted* Unifrac) foram realizadas no pacote *phyloseq* (v.1.36.0) do RStudio (v.4.0.4; *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio Inc., Boston, MA, EUA). Adicionalmente, testes paramétricos/não paramétricos foram utilizados para avaliar a abundância diferencial nos índices alfa. A fim de calcular a diferença entre os índices de diversidade beta, foram utilizadas as análises de variância permutacional e teste de dissimilaridade (PERMANOVA/ADONIS) no pacote *vegan* (v.2.5-7) do RStudio. Testes não paramétricos de Kruskal-Wallis foram usados para identificar os gêneros bacterianos diferencialmente abundantes em relação aos grupos de estudo. Também por meio da análise de correlação de Spearman, considerando valor $p < 0,05$, foram identificados os gêneros bacterianos que apresentaram correlação significativa com a variação das citocinas.

9 APOIO CIENTÍFICO

O projeto teve o apoio do Instituto Sensumed de Pesquisas Ruy França-ISENP, tendo como objetivo tanto o apoio científico quanto o financeiro para análise metagenômica; e Neoprosecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil para as análises de sequenciamento, além do auxílio da FHEMOAM, do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA/UFAM, bem como o apoio institucional da FCECON através do programa de apoio a iniciação científica PAIC/FCECON pelo apoio financeiro.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Dados clínicos dos participantes

O estudo foi seccionado em dois tempos (conforme fluxograma na **Figura 11**). No tempo 1, foram avaliados 36 pacientes (G1, G2 e G3) entre dezembro de 2021 e maio de 2022, com média e desvio padrão de idades $58,7\pm 11,5$; $55,2\pm 18,5$; $38,7\pm 9,5$, em anos, respectivamente, sendo a maioria do sexo masculino (66,7%), com adenocarcinoma (83,3%), submetidos à gastrectomia total (84,0%), pertencentes aos grupos G1 e G2 (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Características sociodemográficas e cirúrgicas de pacientes de todos os grupos do estudo, na FCECON

Características	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
	N=12 N (%)	N=12 N (%)	N=12 N (%)	N=28 N (%)	N=24 N (%)
Sociodemográficas					
Idade anos (média±DP)	58,7±11,5	55,2±18,5	38,7±9,5	55,4±9,8	56,9±17,3
Sexo					
Feminino	6 (50,0)	2 (16,7)	9 (75,0)	11 (39,3)	8 (33,3)
Masculino	6 (50,0)	10 (83,3)	3 (25,0)	17 (60,7)	16 (66,7)
Escolaridade					
Ensino fundamental	6 (50,0)	4 (33,3)	-	8 (28,6)	13 (54,1)
Ensino médio	6 (50,0)	8 (66,7)	-	17 (60,7)	10 (41,7)
Ensino Superior	0 (0,0)	0 (0,0)	-	3 (10,7)	1 (4,2)
Local de nascimento					
Capital	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Interior	12 (100,0)	12 (100,0)	9 (75,0)	28 (100,0)	24 (100,0)
Cirúrgicas					
Tipo de cirurgia					
Gastrectomia total	10 (83,3)	10 (83,3)	-	26 (92,9)	20 (83,3)
Gastrectomia subtotal	2 (16,7)	2 (16,7)	-	2 (7,1)	4 (16,7)
Estadiamento					
T1	0 (0,0)	1 (8,3)	-	1 (3,6)	1 (4,2)
T2	2 (16,7)	1 (8,3)	-	4 (14,3)	3 (12,5)
T3	3 (25,0)	3 (25,0)	-	9 (32,1)	2 (8,3)

T4	7 (58,3)	7 (58,3)	-	14 (50,0)	18 (75,0)
Histologia					
Adenocarcinoma	11 (91,7)	9 (75,0)	-	26 (92,9)	22 (91,7)
GIST	1 (8,3)	2 (16,7)	-	1 (3,6)	2 (8,3)
Linfoma	0 (0,0)	1 (8,3)	-	0 (0,0)	0 (0,0)
TNE	0 (0,0)	0 (0,0)	-	1 (3,6)	0 (0,0)

Esses dados foram idênticos às características epidemiológicas do câncer gástrico no Brasil, 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 (INCA, 2023). Cerca de 84% dos diagnósticos histopatológicos foram compatíveis com adenocarcinoma, um dos tipos de câncer gástrico mais comuns mundialmente (INCA, 2023). Ao analisar os resultados deste estudo comparando com dados publicados por Besagio *et al.*, observam-se dados semelhantes (Besagio *et al.*, 2021).

O estadiamento da doença foi demonstrado pelo método TNM de avaliação mundial para tumores. Um estadiamento avançado (T3 e T4) foi identificado na maioria dos casos, possivelmente associado ao tempo de diagnóstico médico, que pode estar relacionado com o fato de todos os indivíduos deste projeto serem provenientes do SUS (**Tabela 2**).

Importante ressaltar que, a partir daqui, os grupos foram nomeados assim: o grupo G1 de Grupo Probiótico (+), o qual usou probióticos; o grupo G2, de Grupo Probiótico (-), o qual não usou probióticos; o grupo G3, de Grupo Controle, pois representou o teste em participantes saudáveis.

10.2 Dados do estado clínico-nutricional

É importante notar que, dada a gravidade da condição clínica do paciente antes da cirurgia, foi observado nos dados desta pesquisa que a maioria dos casos foram de gastrectomias radicais em vez de conservadoras, cuja abordagem muitas vezes precisa ser feita pela via laparotômica para que seja possível uma visão ampla das estruturas que possam estar acometidas por metástases; isso associado ao estado nutricional prévio à cirurgia, caracterizado por perda ponderal importante e redução de massa muscular. Tais resultados são semelhantes a diversos estudos conduzidos

com pacientes pré-cirúrgicos para neoplasia gástrica, independentemente da proposta de tratamento curativo (Jähne; Piso; Meyer, 2001; Paz *et al.*, 2020; Andreollo; Lopes; Coelho Neto, 2011a; Erawijantari *et al.*, 2020).

Na comparação entre os grupos intervenção (Probióticos (+)) e não intervenção (Probióticos (-)), pacientes do grupo Probióticos (+) permaneceram maior número de dias na UTI (P=0,003). As demais variáveis não apresentaram diferença estatística significativa (**Tabela 3**).

Sabendo disso, pôde-se apontar uma necessidade maior de cuidados intensivos por muitos dos participantes no pós-operatório imediato, (não sendo isso associado neste estudo ao tipo de intervenção da pesquisa). Desde 1936, Studley, nas publicações clássicas sobre o tema, já relatava associação entre a desnutrição, a redução da resposta imune e complicações no pós-operatório de grandes cirurgias, especialmente naquelas digestivas superiores (Mueller *et al.*, 2017).

Em relação ao IMC avaliado, quando comparados os grupos, não se notaram diferenças estatísticas. Ao avaliar o perfil etário dos participantes da pesquisa, notou-se que a média de idade variou entre 55 e 63 anos, compatíveis com um perfil de IMC diferenciado, pois a maioria dos participantes já eram classificados na faixa etária idosa no Brasil. Com isso, percebeu-se então que o risco nutricional já estava instalado mesmo antes do procedimento cirúrgico em ambos os grupos.

As razões mais comuns para a perda de peso são a redução na ingestão de alimentos, o aumento das necessidades nutricionais induzido pelo tumor e o aproveitamento ineficiente dos nutrientes, o que será descrito posteriormente neste estudo (Fukuda *et al.*, 2016). A maior incidência e a maior gravidade da perda de peso foram documentadas no câncer gástrico e no pancreático, nos quais 85% dos pacientes apresentam caquexia (Fukuda *et al.*, 2016).

Tabela 3 – Características clínicas de pacientes submetidos a procedimento cirúrgico na FCECON, segundo grupos de probióticos (+) e probióticos (-) (N=24), nos momentos perioperatórios.

Características	Grupos		P-valor
	Probiótico (+) N=12	Probiótico (-) N=12	
Faixa etária e Sexo			
Idade em anos (média±DP)	62,7±12,2	54,8±15,8	0,187a
Sexo			0,069b
Feminino	6 (50,0)	1 (8,3)	
Masculino	6 (50,0)	11 (91,7)	
Antropométricas			
Peso em kg (média±DP)	57,6±15,0	64,1±15,3	0,299a

Índice de Massa Corporal em kg/m ^a (média±DP)	23,3±4,6	24,2±5,0	0,634a
Dieta em dias			
Nada por via oral	2,0 (1,0-2,0)	1,5 (0,3-2,0)	0,266c
Via oral	4,0 (3,0-6,5)	4,0 (1,0-5,5)	0,443c
Nutrição enteral/parenteral	5,5 (0,0-7,8)	1,5 (0,3-7,5)	0,671c
Desfechos pós-operatórios			
Dias de internação (média±DP)	11,0±3,5	8,5±4,5	0,146a
Dias em UTI (Mediana e II)	3,0 (2,0-4,8)	0,0 (0,0-2,0)	0,003c
Infecção de FO			0,102d
Não	4 (33,3)	8 (66,7)	
Sim	8 (66,7)	4 (33,3)	
Reoperação			
Não	11 (91,7)	9 (75,0)	0,590b
Sim	1 (8,3)	3 (25,0)	
Fístula			0,999b
Não	11 (91,7)	11 (91,7)	
Sim	1 (8,3)	1 (8,3)	
Íleo adinâmico			0,999b
Não	11 (91,7)	12 (100,0)	
Sim	1 (8,3)	0 (0,0)	
Diarreia			0,590b
Não	9 (75,0)	11 (91,7)	
Sim	3 (25,0)	1 (8,3)	
Vômito			0,999b
Não	9 (75,0)	10 (83,3)	
Sim	3 (25,0)	2 (16,7)	
Óbito			0,999b
Não	11 (91,7)	12 (100,0)	
Sim	1 (8,3)	0 (0,0)	

Fonte: O autor (2022)

Legendas: P: a: Teste T de Student; b: Teste Exato de Fischer; c: Teste Mann-Whitney; d: Teste Qui-quadrado de Pearson. Variáveis quantitativas estão descritas na forma de média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil; variáveis categóricas, em números absolutos e relativos. DP: Desvio padrão; II: Intervalo interquartil; Probióticos (+): grupo que usou probiótico no pós-operatório; Probióticos (-): grupo que não usou probióticos no pós-operatório.

O percentual de perda de peso foi superior no grupo Probióticos (-) em ambos os períodos cirúrgicos (P=0,049).

Em estudo publicado por Butters *et al.*, 1996, os autores demonstraram que a perda de peso é frequente na doença maligna, principalmente nas neoplasias do trato gastrointestinal superior (Butters *et al.*, 1996), o que também foi observado nestes resultados. Salienta-se que estes têm íntima relação com a localização da doença, pois, por ser do trato digestivo, influencia diretamente no estado nutricional; pode-se afirmar que tal interferência ocorre inclusive no perfil imunológico quando se observam os dados a seguir sobre o risco nutricional associado à redução de linfócitos.

Após tratamento cirúrgico em ambos os grupos, houve redução das medidas da CB ($P=0,001$), ângulo de fase ($P<0,001$), linfócitos ($P=0,004$), % de linfócitos totais ($P=0,002$) e CTLP ($P=0,007$).

Os pacientes deste estudo apresentaram menores valores de ângulo de fase em relação ao grupo probiótico (-), cujos resultados foram semelhantes àqueles documentados em pacientes com outros tipos de tumores (Toso *et al.*, 2003). E os resultados foram idênticos aos descritos por estudos com câncer gástrico (Paz *et al.*, 2020). Menores valores de ângulo de fase têm sido atribuídos à lesão de membranas celulares e dos tecidos tumorais (Toso *et al.*, 2003) e associados ao pior estado nutricional em pacientes com câncer de cólon avançado (Gupta *et al.*, 2008) ao estágio tumoral (Pérez Camargo *et al.*, 2017) e com a sobrevida de pacientes oncológicos (Grundmann; Yoon; Williams, 2015). Além disso, o ângulo de fase foi diretamente relacionado à massa muscular (Grundmann; Yoon; Williams, 2015).

No grupo probiótico (-) após tratamento cirúrgico, houve redução das medidas da CMB ($P=0,004$), % da CMB ($P=0,006$), EMAP ($P=0,005$) e aumento da albumina ($P=0,016$). Demais variáveis não apresentaram diferença estatística significativa entre grupos, entre os tempos e no comportamento dos grupos ao longo do tempo (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Comparação de variáveis antropométricas e bioquímicas, entre grupos pré e pós-cirurgia e comportamento dos grupos ao longo do tempo de pacientes submetidos a procedimento cirúrgico no setor de cirurgia da FCECON, segundo grupos probiótico (+) e probiótico (-) (N=24).

Variáveis	Grupos		Grupo	P Tempo	Grupo vs. tempo
	Probiótico (+) Média±DP	Probiótico (-) Média±DP			
Antropométricas					
Peso (kg)			0,226	0,067	0,725
Pré	57,6±4,1	64,1±4,2			
Pós	56,1±3,9	63,1±3,8			
IMC (kg/m ²)			0,572	0,112	0,841
Pré	23,3±1,3	24,2±1,4			
Pós	22,7±1,2	23,7±1,2			
% de perda de peso			0,049	0,068	0,519
Pré	11,3A±2,2	19,5B±3,6			
Pós	13,6A±2,0	20,6B±3,1			
Circunferência do braço (cm)			0,333	0,001	0,640
Pré	26,7a±1,3	28,4a±1,1			
Pós	25,9b±1,1	27,4b±1,1			
% circunferência braço			0,481	0,625	0,446
Pré	88,2±3,8	90,1±3,4			

Pós	85,6±3,0	90,7±4,7			
Dobra cutânea tricipital (mm)			0,741	0,806	0,095
Pré	9,2±0,7	9,3±1,8			
Pós	9,8±1,4	8,4±1,7			
% dobra cutânea tricipital			0,656	0,917	0,082
Pré	63,9±8,4	79,8±18,4			
Pós	70,7±14,3	72,9±17,0			
CMB (cm)			0,299	0,004	0,685
Pré	24,1±1,3	25,4a±1,1			
Pós	22,5±0,9	24,2b±1,0			
% CMB			0,598	0,006	0,561
Pré	96,1±4,2	94,8a±3,5			
Pós	89,8±3,1	85,2b±6,1			
EMAP (cm)			0,229	0,005	0,389
Pré	10,3±1,8	13,8a±1,4			
Pós	9,6±1,8	12,0b±1,6			
Ângulo de fase (°)			0,186	<0,001	0,942
Pré	5,6a±0,4	6,3a±0,4			
Pós	4,8b±0,4	5,4b±0,4			
Bioquímicas					
Albumina (g/dL)			0,453	0,016	0,841
Pré	3,4±0,2	3,2a±0,2			
Pós	3,6±0,2	3,5b±0,1			
Leucócitos totais (/µL)			0,552	0,185	0,915
Pré	8268,8±561,6	7778,4±1304,8			
Pós	9373,8±563,7	8718,4±839,5			
Linfócitos (mm ³)			0,973	0,004	0,649
Pré	2077,3a±132,2	2024,8a±209,3			
Pós	1740,0b±153,0	1778,5b±137,4			
% de linfócitos totais			0,223	0,002	0,639
Pré	25,7a±1,2	29,7a±2,3			
Pós	20,3b±2,9	22,3b±2,4			
CTLTP (und/mm ³)			0,976	0,007	0,774
Pré	2052,4a±144,9	2029,9a±211,8			
Pós	1753,5b±154,2	1788,9b±140,4			
Hemoglobina (g/dL)			0,668	0,134	0,873
Pré	11,6±0,8	11,3±0,9			
Pós	10,8±0,5	10,3±0,5			
Calprotectina (mcg/g)			0,160	0,377	<0,001
Pré	48,5±2,8	44,8a±2,8			
Pós	40,9A±2,7	54,8Bb±2,7			

Fonte: O autor (2022)

Nota: P: Equações de Estimação Generalizada com Post Hoc de mínima diferença significativa (LSD). DP: Desvio padrão; IMC: Índice de massa corporal; CMB: Circunferência muscular do braço; EMAP: Espessura do músculo adutor do polegar; CTLTP: Contagem total de linfócitos periféricos.

Em comparação a todas as variáveis nos grupos controle e intervenção em relação ao tempo pós-operatório, algumas destas acompanharam a perda de peso, como as variáveis CB, CMB, AF, CTLTP e EMAP (**Tabela 4**). Quando avaliado o tempo pré e pós-operatório entre os grupos, viram-se resultados notáveis que corroboram a

clínica dos participantes – EMAP(P=0,005), AF(P=0,001), CTLP(P=0,007). Esses dados descritos são semelhantes aos da literatura clássica para avaliação do estado nutricional em doentes cirúrgicos e em escores prognósticos para desfechos clínicos (Fukuda *et al.*, 2016).

Um dado interessante foi a avaliação da calprotectina fecal (CF), com a qual se identificou uma mudança estatisticamente significativa na CF(P=0,001). Quando este marcador foi avaliado com análises Post Hoc de grupos *versus* tempos (pré e pós-operatórios), observou-se uma mudança no grupo probiótico (+) sabendo-se que a literatura avança hipóteses de que a microbiota tem poder de modular a inflamação tecidual intestinal (Paul *et al.*, 2015). Os resultados deste estudo se assemelham a essa afirmativa quando se contempla a redução dos níveis de CF no grupo probiótico (+) (Lee, Ji Ae *et al.*, 2021).

Partindo dessa premissa, buscou-se avaliar esse marcador, que parece fornecer uma perspectiva panorâmica da inflamação tecidual intestinal, e buscou-se relacioná-lo com a intervenção usando probióticos. Em análise clínica, ressalta-se que os resultados relatados neste estudo não representam padrões compatíveis com altos graus de inflamação intestinal como nos casos de doenças inflamatórias intestinais, conforme demonstrado por (Walsham; Sherwood, 2016).

10.3 Dados da avaliação das complicações cirúrgicas

No segundo tempo do estudo foram avaliados, por meio da escala de Clavien-Dindo (**Quadro 6**), 52 pacientes ao total, de um N programado (N=64), pertencentes aos grupos G4 e G5. Em virtude das perdas, 12 pacientes foram excluídos por motivos diversos, entre os quais palição, mudança de cirurgia, suspensão de cirurgia, pico hipertensivo, eventos ocorridos durante o período perioperatório. Foram realizadas avaliações entre maio de 2023 e janeiro de 2024. Os 52 pacientes randomizados tinham média e desvio padrão de idade entre 55,4±9,8 e 56,9±17,3, respectivamente, sendo a maioria do sexo masculino (63,4%), com adenocarcinoma (92,3%), submetidos à gastrectomia total (88,4%), em média entre G4 e G5 (**Tabela 2**).

Os achados mais comuns deste estudo em relação às complicações pós-operatórias foram: náuseas e vômitos (N=39, 75%), febre (N=12, 22%), internação em UTI (N=33, 65%) e reexploração cirúrgica (N=5, 10%). Achados tais como fístulas e

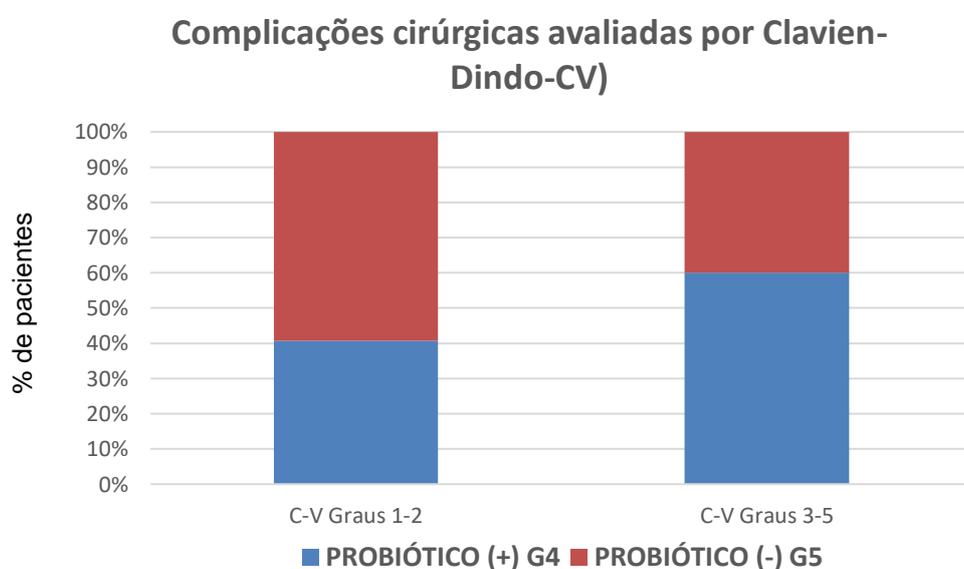
deiscências de sutura não foram observados durante o *follow-up*; não se registraram óbitos no decorrer da pesquisa. Estudo que acompanhou 300 pacientes gastrectomizados relatou dados semelhantes ao presente estudo, exceto quanto à mortalidade, aqui não relatada (Andreollo; Lopes; Coelho Neto, 2011b).

Em adição, outro estudo avaliou as complicações que necessitavam de reexploração cirúrgica; observou-se que seus dados corroboram os do presente estudo em relação ao nível relativamente reduzido dessas complicações (Braghetto *et al.*, 2020).

Quanto aos probióticos relacionados a ocorrências de complicações pós-operatórias, os dados desta pesquisa não foram positivamente relacionados ao grupo probiótico (+), não havendo diferenças quando avaliado o seu uso ou não na redução das complicações (**Figura 13**).

Compararam-se os dados deste estudo com os da literatura e observou-se, por meio de uma revisão sistemática, que, para que haja uma mínima modulação da microbiota intestinal na expectativa de que isso possa interferir positivamente na redução de complicações, o tempo de uso de probióticos gira em torno de oito semanas (Senga; Liu; Frangella, 2023).

Figura 13 – Avaliação das complicações cirúrgicas entre os grupos probiótico (+) G4 e probiótico (-) G5.



Fonte: O autor

Dentre os resultados desta pesquisa, foi possível observar um maior percentual de classificados em graus 3 a 5 de C-V, com muitas complicações (60%) no grupo probiótico (+), o que demonstra não haver interferência positiva na redução de complicações ao usar sete dias de probióticos conforme o protocolo deste estudo.

10.4 Dados da avaliação de mediadores solúveis da inflamação

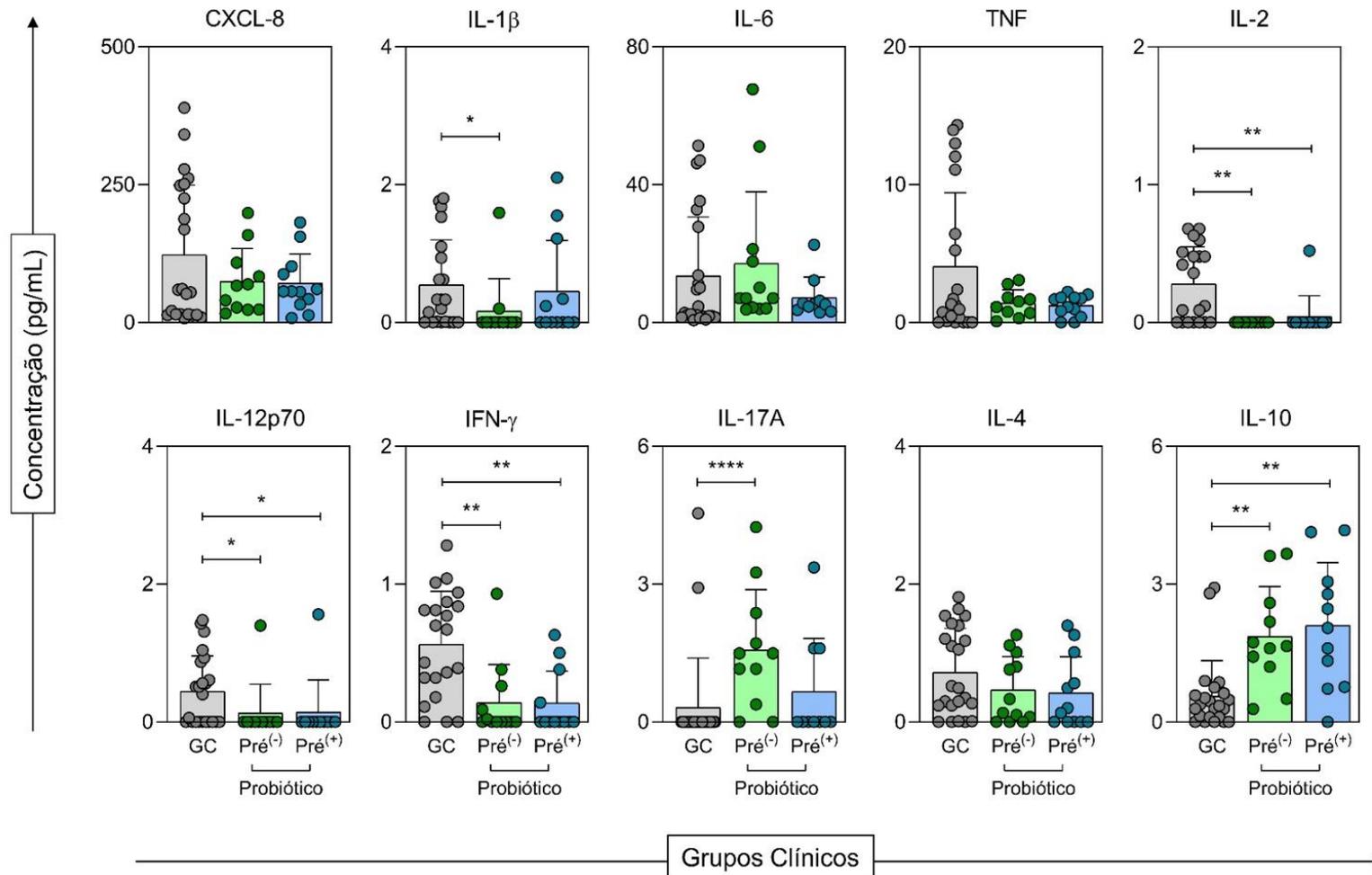
Dos grupos avaliados durante a pesquisa, apenas os grupos probiótico (+) (N=12), probiótico (-) (N=12) – ambos, antes e depois da intervenção – e grupo controle (N=12) fizeram coleta de soro para quantificação dos mediadores imunológicos solúveis, também chamados de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Assim, foram realizadas as análises das citocinas CXCL-8, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-2, IL-12p70, INF- γ , IL-17A, IL-4 e IL-10 no sangue periférico de 24 pacientes com câncer gástrico e de 12 indivíduos saudáveis no grupo controle (GC) com média de idade de 62,7 anos (\pm 12,2). Vale ressaltar que o grupo de pacientes com câncer gástrico foi dividido em pacientes que receberam ou não a intervenção com probióticos (Pré⁽⁺⁾ e Pré⁽⁻⁾, respectivamente).

A **Figura 14** mostra o perfil de moléculas imunológicas antes da intervenção, sendo observado que os pacientes com câncer gástrico apresentavam quadro de imunossupressão, com concentração significativamente menor das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-12p70 e INF- γ , com aumento significativo da citocina regulatória IL-10. Adicionalmente, foi observado aumento da citocina IL-17A, mas com resultado significativo apenas no grupo de pacientes com câncer gástrico que não receberam intervenção com probióticos (Pré⁽⁻⁾).

Esses dados vão ao encontro do que foi publicado por Sanches *et al* em 2017, que relataram que os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IFN γ , IL-4 podem prever a malignidade de uma lesão gástrica. Isso está associado aos resultados da presente pesquisa com o prognóstico do câncer gástrico, além de ficar evidenciado o estado de imunossupressão nos casos de câncer, quando comparados com o controle (Sánchez-Zauco *et al.*, 2017). Corroborando dados de estudos acerca de câncer gastrointestinal, dados importantes do presente estudo assinalam uma redução das citocinas inflamatórias e aumento das regulatórias, o que pode mostrar o papel imunossupressor do câncer (Li, Jun *et al.*, 2016).

Uma resposta anti-inflamatória sistêmica Th1 foi observada também com uma maior expressão da IL-10, que é uma citocina que inibe a produção de várias citocinas inflamatórias por macrófagos e CDs (células dendríticas) ativadas, incluindo IL-1, TNF e IL-12; e, quando se observou a sua expressão, pôde-se notar que, em comparação ao grupo controle, foi expressivamente maior. Isso denota uma ativação de linfócitos Treg no intuito de controlar a produção de citocinas pro-inflamatórias (Sonnenberg; Artis, 2015).

Figura 14 – Concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias entre os grupos controle e de pacientes sem e com intervenção com probióticos no pré-operatório



Legenda: ** p-valor <0,05 *** p-valor <0,001.

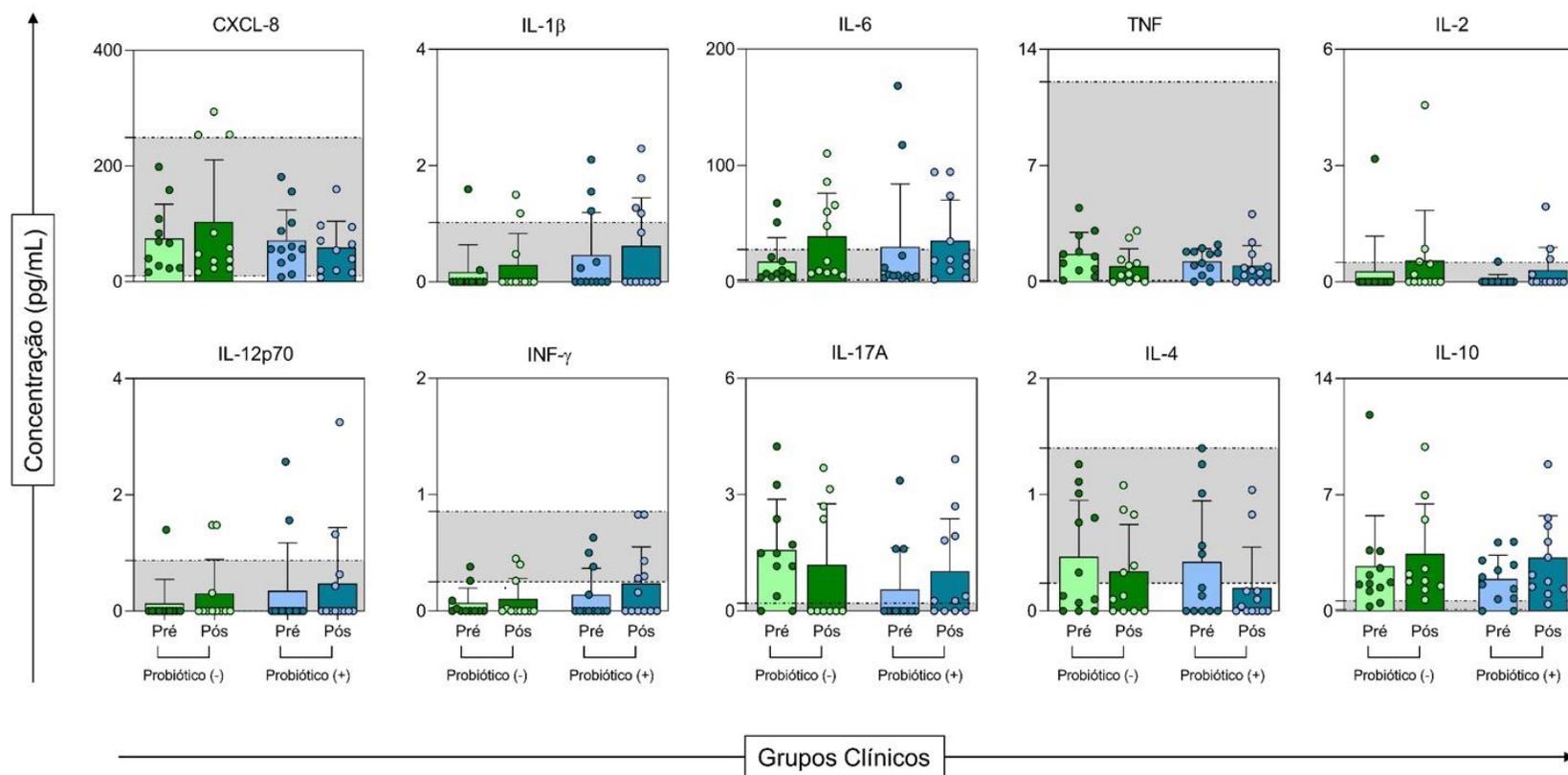
Quando se analisa a concentração dessas moléculas imunológicas após a intervenção com probióticos e o procedimento cirúrgico, observa-se que não há diferenças significativas entre as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias entre os grupos de pacientes com câncer gástrico (**Figura 14**). Embora não seja observada produção significativamente maior no grupo que fez o uso de probióticos (Pós⁽⁺⁾), é digno de nota que esses pacientes apresentaram concentração maior de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-2 IL-12p70, INF- γ e IL-17A), com menor produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4) e regulatórias (IL-10) quando se compara com a concentração de citocinas antes da intervenção com probióticos e o procedimento cirúrgico.

Tratando-se da resposta Th17, que é representada principalmente pela citocina IL-17A, no presente estudo, no grupo intervenção com probióticos, houve uma discreta redução quantitativa quando comparada com o mesmo grupo no momento pré-operatório; infere-se que essa resposta pode ter sido modulada pela IL-10 que foi demonstrada na **Figura 14**. Isso pode se dar por processo de reconstituição imune após a retirada do câncer (Waśkiel-Burnat *et al.*, 2021). É importante modular o processo de resposta imunológica; nesses pacientes, este estudo mostrou o potencial do uso de probióticos nessa premissa, com o que se observou uma tendência ao controle da resposta imune no grupo probiótico (+).

Quanto aos níveis levemente elevados de IL-4 em pacientes com intervenção em comparação ao grupo controle encontrados neste estudo, são consistentes com o que foi descrito anteriormente (Villagran *et al.*, 2021a; Bednarz-Misa *et al.*, 2020), uma vez que essa citocina foi encontrada elevada em outros estudos em todos os tipos de CG, mas também no câncer colorretal, especialmente quando quantificada localmente no microambiente tumoral. A IL-4 tem sido associada a pacientes com CG que apresentam alta taxa de mortalidade e disseminação de lesões primárias. Também foi descrito que os níveis plasmáticos dessa citocina se correlacionam com os níveis detectados na área próxima ao tumor (Bednarz-Misa *et al.*, 2020).

Quando se observam os níveis de IL-4 entre os grupos, notou-se que, no grupo intervenção com probióticos, essas concentrações parecem reduzir levemente mesmo na vigência do procedimento cirúrgico, porém os dados estatísticos mostram que o uso de probióticos não pareceu ter relação positiva sobre a IL-4 nesse grupo (p -valor $>0,05$) (Erawijantari *et al.*, 2020) (**Figura 15**).

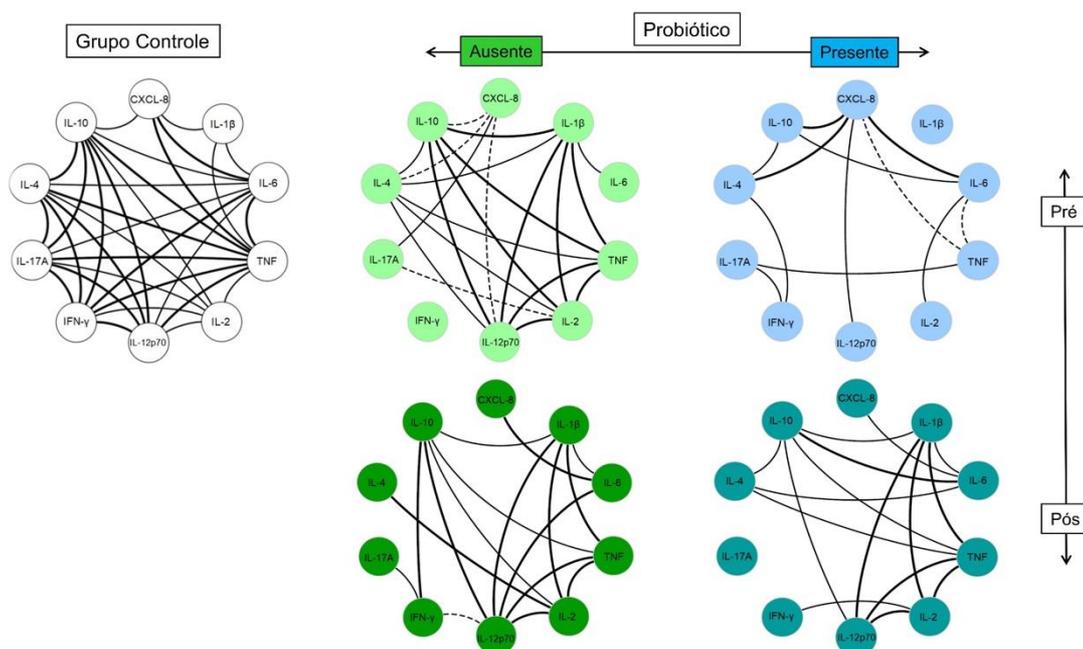
Figura 15 – Concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias entre os grupos controle e de pacientes sem e com intervenção com probióticos no pós-operatório



Legenda: ** p-valor <0,05 *** p-valor <0,001.

Em seguida, avaliou-se a interação das moléculas imunológicas antes e após a intervenção e procedimento cirúrgico realizado nos pacientes com câncer gástrico. Na **Figura 16**, observa-se que os pacientes com câncer gástrico na fase pré-operatória apresentavam poucas interações quando comparado ao grupo controle, o que evidencia o processo de imunossupressão destes. Além disso, nota-se que o grupo Pré⁽⁺⁾ que viria a receber o uso de probióticos apresentava poucas interações das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-2 e IL-12p70). Após a realização do procedimento cirúrgico nos grupos sem e com intervenção do uso de probiótico, notou-se que os pacientes apresentaram interações mais concentradas em algumas citocinas inflamatórias e redução no número de interações da citocina regulatória IL-10.

Figura 16 – Rede de interação entre as moléculas imunológicas entre os grupos controle e de pacientes sem e com intervenção com probióticos no pré e pós-operatório.



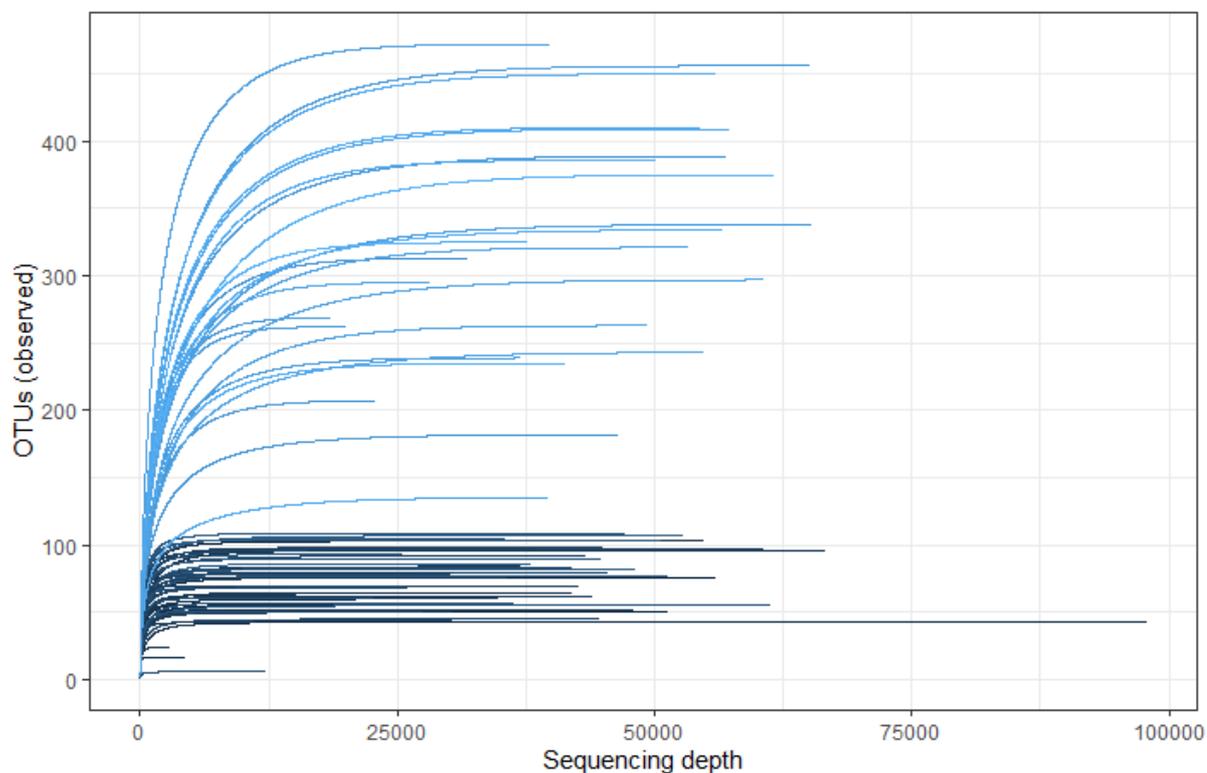
10.5 Dados da microbiota intestinal

10.5.1 Resultado do processamento das *reads*

A fim de determinar o número de *reads* necessárias para garantir a cobertura de toda a diversidade bacteriana (saturação), curvas de rarefação foram construídas

para todas as amostras, com um platô que indicava todas elas com o número de *reads* obtidas em cada uma delas (**Figura 17**).

Figura 17 – Curva de saturação das 36 amostras sequenciadas.



Onde: OTU – Unidade taxonômica operacional

Fonte: O autor.

Foram observados diferentes perfis de curvas de saturação para as amostras: algumas saturaram em torno de 25.000 *reads*; a maioria, por volta de 30.000 *reads*; e, para outras poucas, mais de 50.000 *reads* foram necessárias. Tal variação pode ser explicada por algumas razões, tais como a própria variabilidade microbiana individual do ser humano.

10.5.2 Diversidades alfa e beta

A diversidade alfa permite indicar quão diversa é a comunidade bacteriana de uma amostra. Para isso, observa-se a riqueza, que se refere ao número de espécies observadas; e a abundância (frequência), que considera a distribuição dessas

diferentes bactérias na amostra. Dentre os principais índices utilizados para determinação da diversidade alfa, pode-se citar o *Observed*, que avalia exclusivamente a riqueza de bactérias; o Shannon, que considera tanto a riqueza quanto a abundância, com maior peso na primeira; o Simpson, que, ao contrário do Shannon, coloca maior peso na abundância; e, por último, o Chao1 (que não foi avaliado neste estudo), que considera a riqueza, mas também leva em consideração as espécies menos abundantes na amostra (identificadas apenas uma ou duas vezes) (Lande, 1996).

Para a avaliação da diversidade, inicialmente analisou-se as amostras de conteúdo fecal. Em nível de OTU, na avaliação da diversidade alfa, compararam-se pacientes que fariam gastrectomia por câncer no pré e pós-operatório, o que mostra que a cirurgia tem potencial de modificar a diversidade alfa bacteriana (**Figura 18**).

Não se observaram diferenças significativas em nenhum dos índices avaliados (*Observed* e Shannon), com *p*-valor 0,66 e 0,2, respectivamente (**Figura 18 A, B e C**).

Figura 18 – Diversidade alfa da microbiota bacteriana recuperada de amostras fecais no pré e pós-gastrectomia por câncer no Amazonas. Diversidade alfa: teste T para os índices Observed e teste não paramétrico de Mann-Whitney para os índices de Shannon.

Figura 18-A – Índices Observed e Shannon da microbiota bacteriana, sem uso de probióticos, antes e após a gastrectomia.

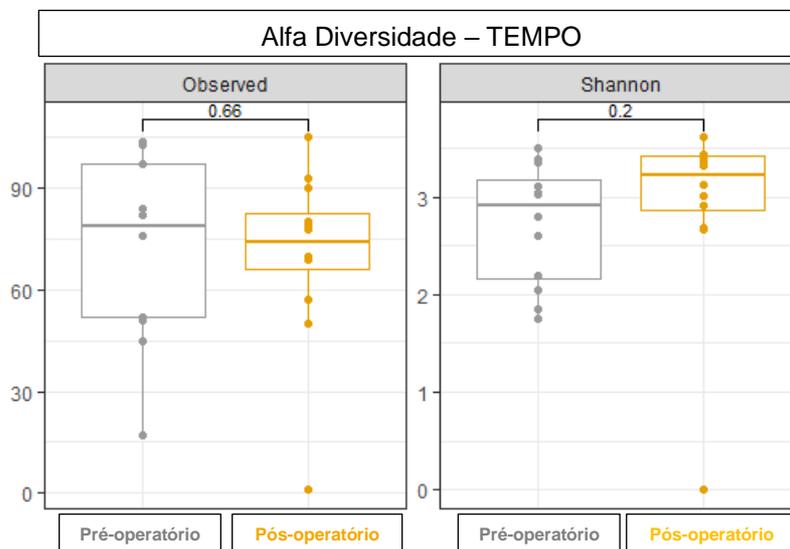


Figura 18-B – Diversidade alfa da microbiota bacteriana em relação à abundância relativa de classes de bactérias (%), sem uso de probióticos, antes e após a gastrectomia.

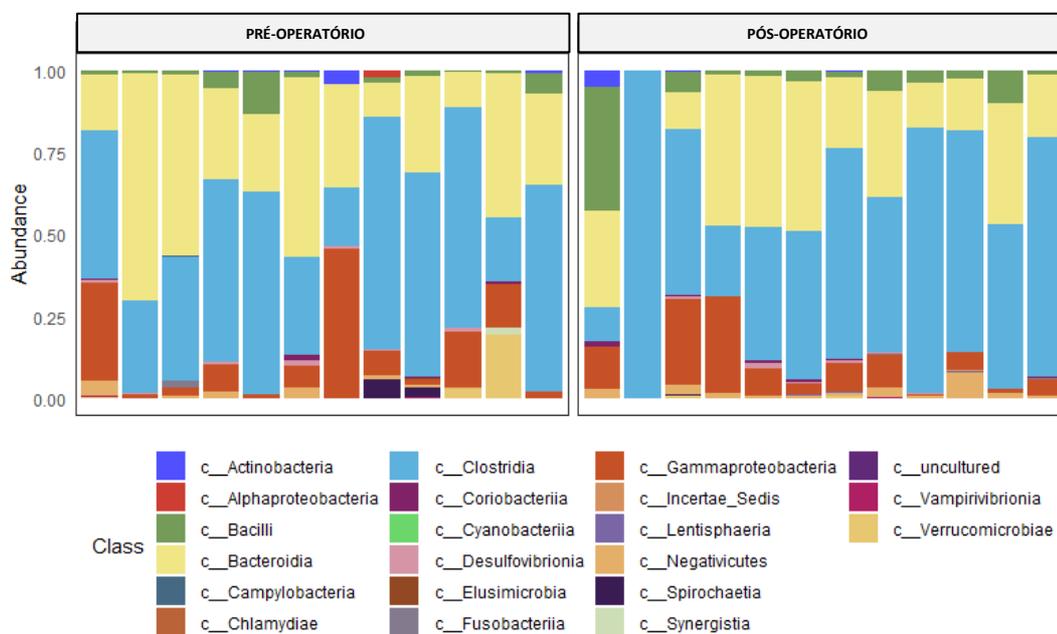
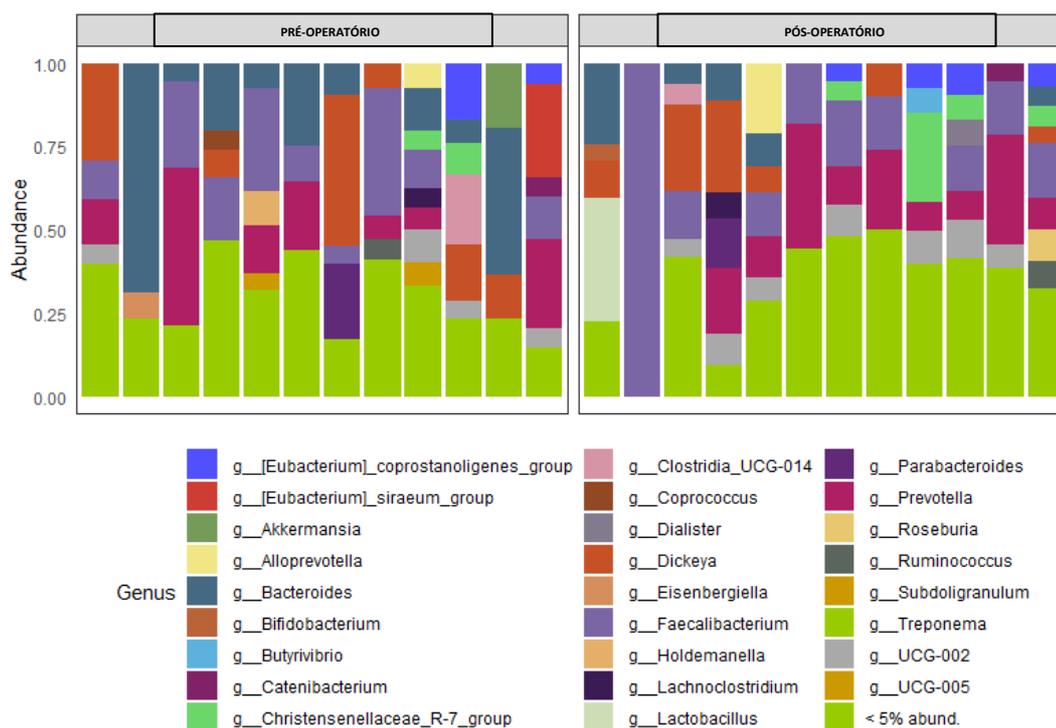


Figura 18-C – Diversidade alfa da microbiota bacteriana em relação à abundância relativa de gêneros de bactérias, sem uso de probióticos, antes e após a gastrectomia.



Em seguida, avaliaram-se também as diversidades alfa (*Observed* e Shannon) em relação às variáveis clínicas como Clavien-Dindo (**Figura 19 D**) (mede grau de complicações no pós-operatório), ângulo de fase (**Figura 18 E**) e estadiamento clínico do câncer (**Figura 18 F e G**).

Figura 18-D – Diversidade alfa da microbiota bacteriana pelos índices Observed e Shannon em relação ao grau de complicações Clavien-Dindo com uso de probióticos.

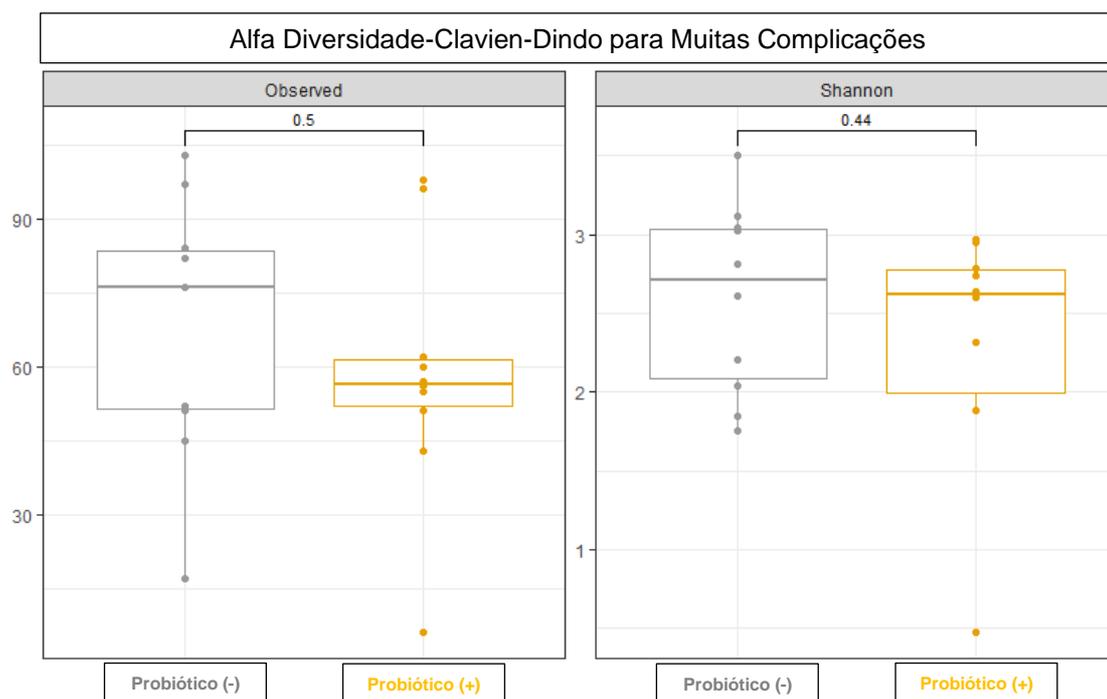
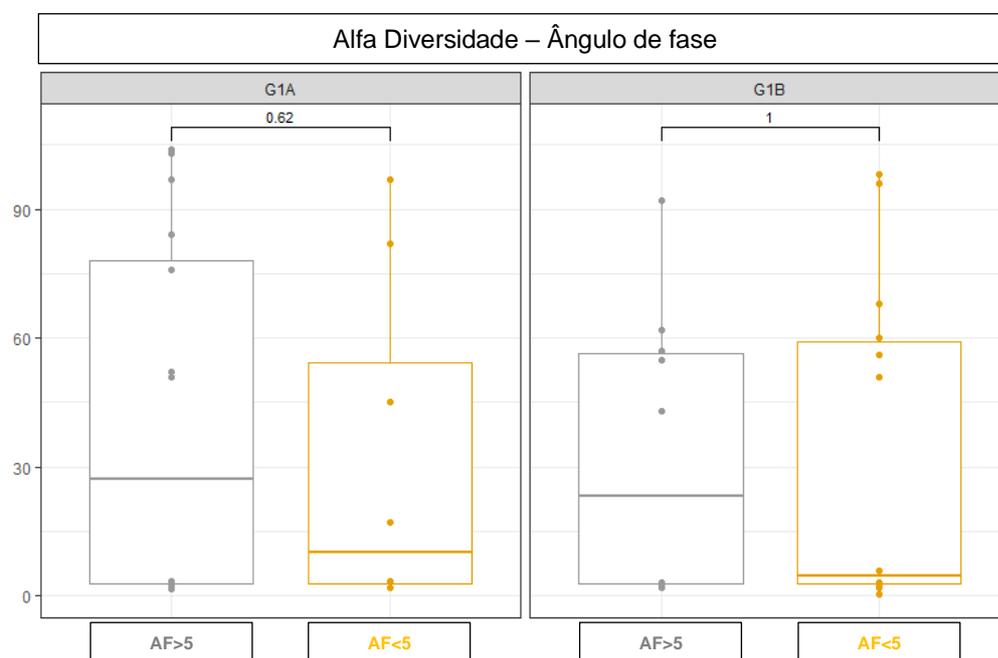


Figura 18-E – Diversidade alfa da microbiota bacteriana em relação ao ângulo de fase (AF°), sem uso de probióticos, antes e após a gastrectomia.



Legenda: AF° – Ângulo de Fase.

Figura 18-F – Índices Observed e Shannon da microbiota bacteriana em relação ao estadiamento do câncer, sem uso de probióticos, antes e após a gastrectomia.

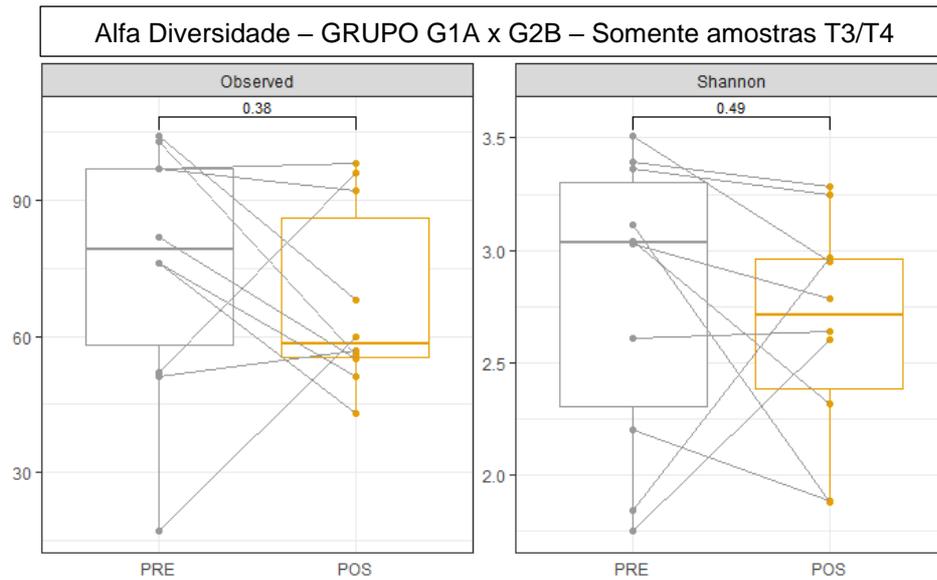


Figura 18-G – Diversidade alfa da microbiota bacteriana em relação à abundância relativa de gêneros de bactérias em relação ao estadiamento do câncer (T3 e T4) sem uso de probióticos.

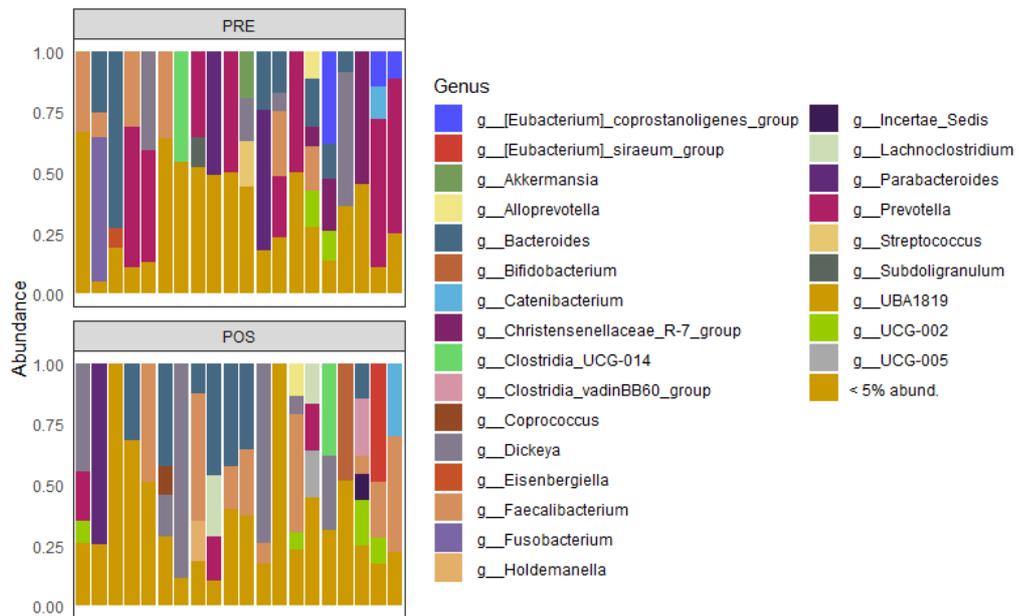


Figura 18-H – Diversidade alfa da microbiota bacteriana em relação às diferenças entre os grupos controle e câncer.

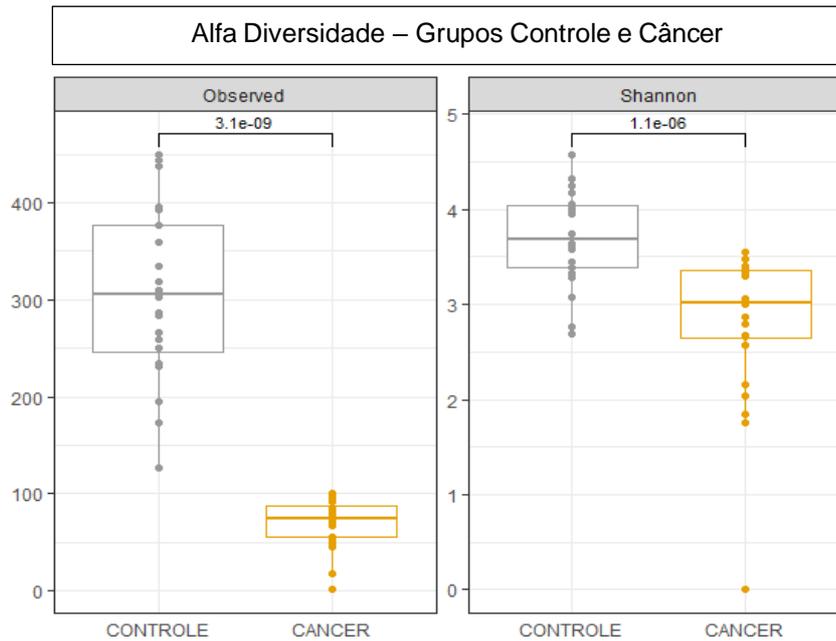
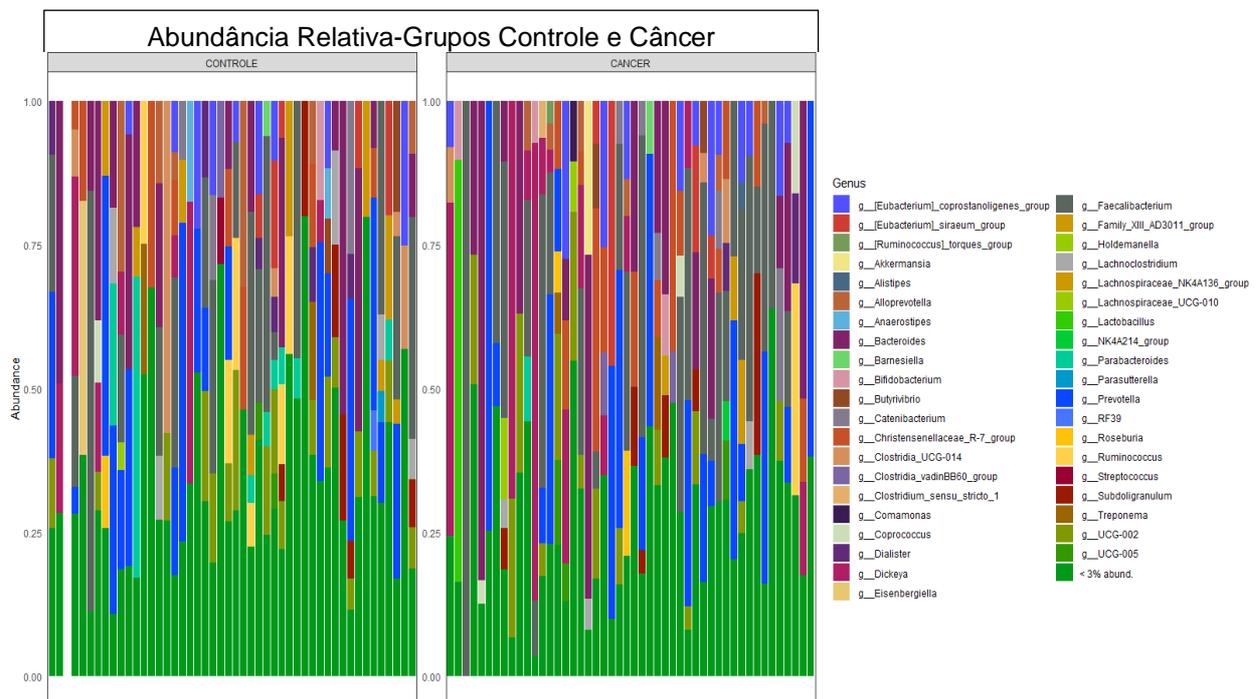


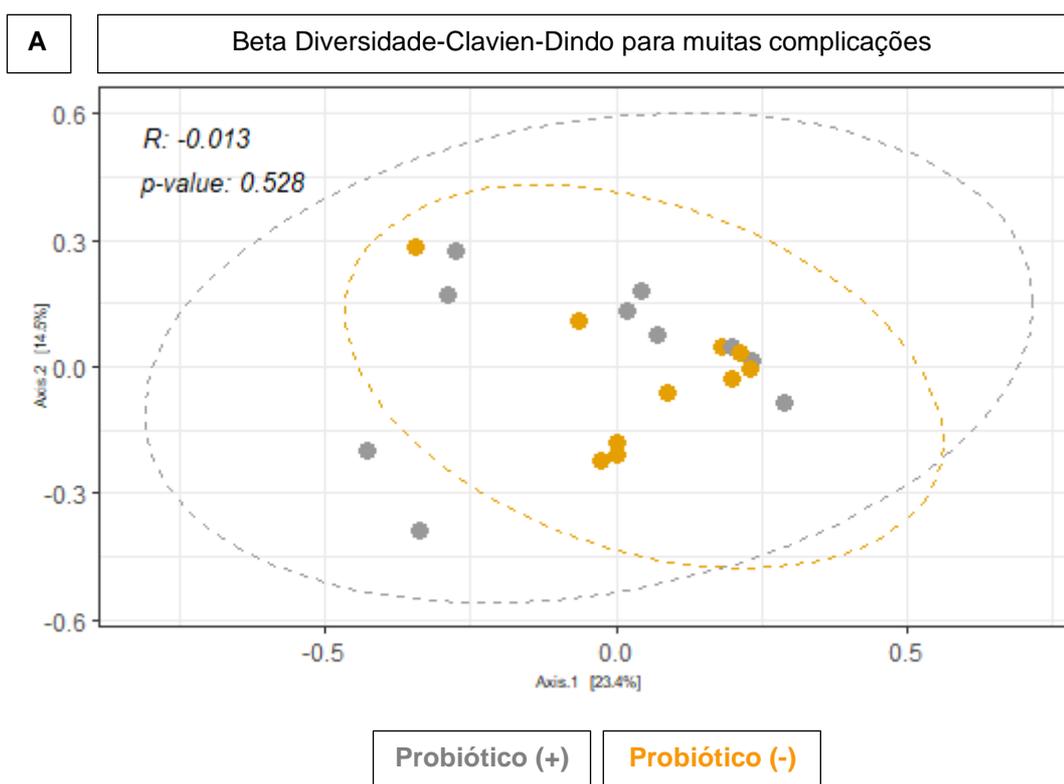
Figura 18-I – Abundância relativa em relação às diferenças entre os grupos controle e câncer no pré-operatório.

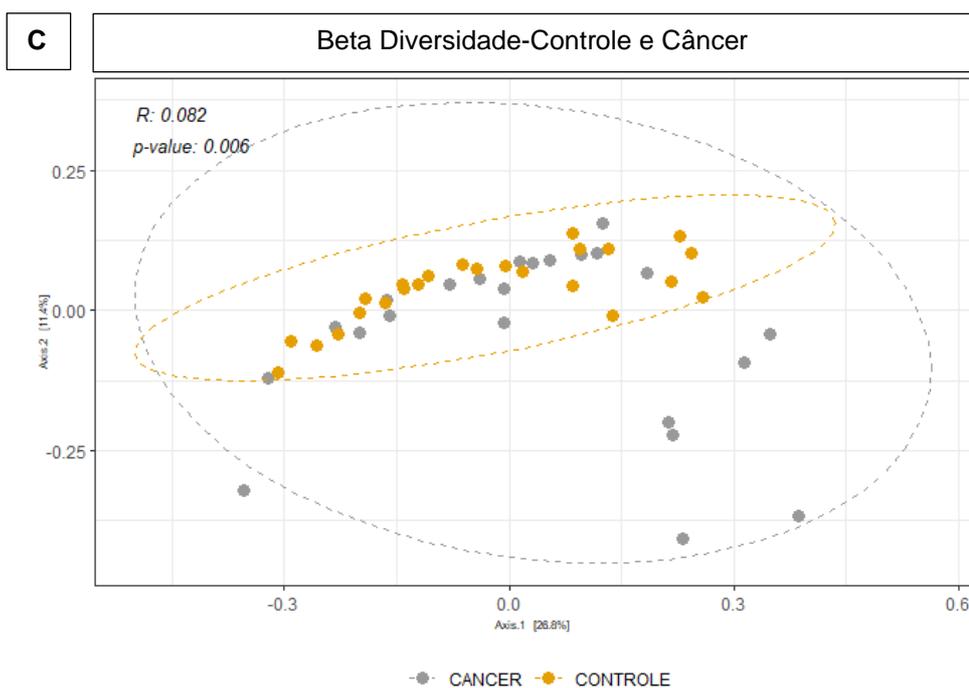
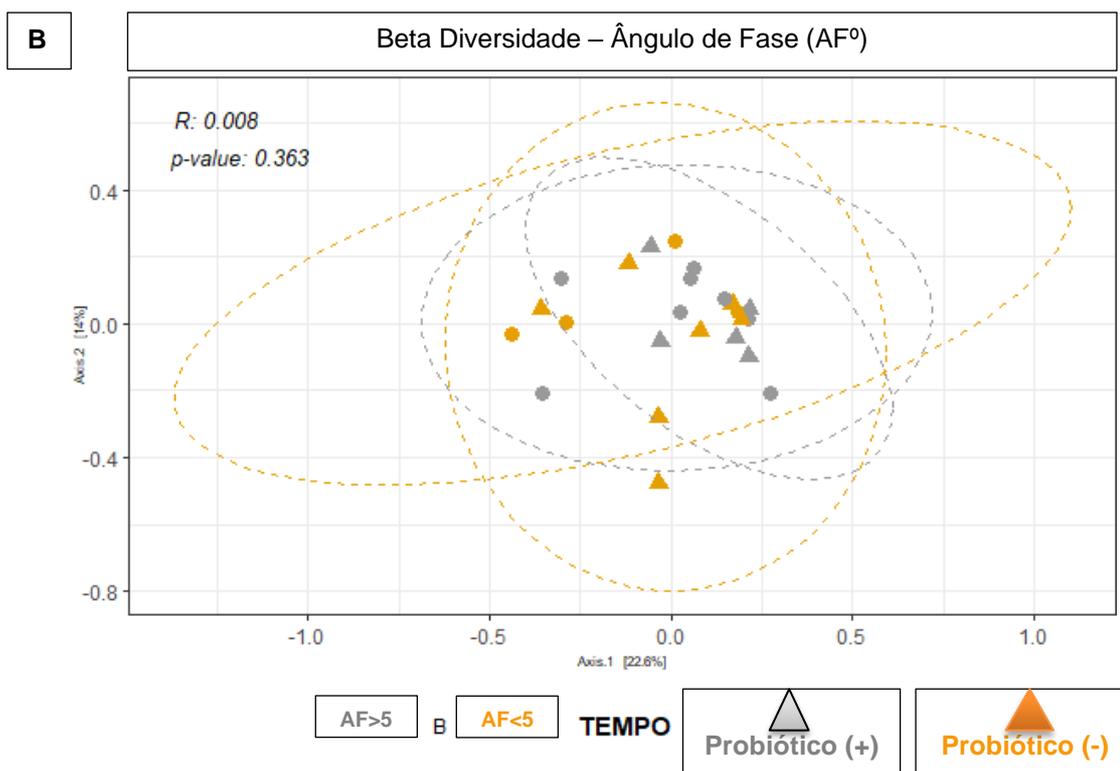


No que diz respeito à configuração bacteriana nas fezes tanto no grupo câncer quanto no controle, em diferentes períodos de avaliação, que incluem os momentos pré e pós-operatório, bem como o uso ou não de probióticos, nenhum índice de diversidade alfa demonstrou divergência significativa (p -valor > 0,05) (Koga, 2022).

Quanto à diversidade beta, que avalia as dissimilaridades tanto qualitativas, quanto quantitativas entre as amostras, observa-se a similaridade das abundâncias e a distância entre as bactérias na árvore filogenética de forma que, quanto mais próximas, mais similares as comunidades. O índice *Unweighted UniFrac* considera apenas as distâncias filogenéticas entre as bactérias, enquanto o *Weighted UniFrac* leva em consideração também as abundâncias relativas entre os microrganismos (Lozupone *et al.*, 2007). Na avaliação da diversidade beta por meio do método de redução de dimensionalidade *Principal Coordinates Analysis (PCoA)*, também não foram observadas diferenças entre os dois grupos probióticos e controle (**Figura 19A, B**).

Figura 19 – Diversidade beta da microbiota bacteriana recuperada de amostras fecais no pré e pós-gastrectomias por câncer no Amazonas. A) em relação ao grau de complicações Clavien-Dindo (p-valor 0,528); B) em relação ao ângulo de fase (AF°) (p-valor 0,363); C) em relação às diferenças entre os grupos controle e câncer. Diversidade beta: R: coeficiente de dissimilaridade ADONIS/PERMANOVA





Na avaliação da diversidade beta por meio do método de redução de dimensionalidade *Principal Coordinates Analysis* (PCoA), também não foram observadas diferenças entre os dois grupos (**Figura 19B**).

A composição da microbiota aderida à mucosa intestinal varia significativamente, a depender da região amostrada. Vuik e colaboradores, em 2019, coletaram biópsias em nove regiões diferentes do intestino, contemplando tanto o trato

gastrointestinal alto (esôfago até o íleo proximal), quanto o baixo (íleo distal até o reto) (Vuik *et al.*, 2019). Isso foi observado no presente estudo, pois o material fecal usado para avaliação refletiu a microbiota transiente em todos os segmentos do intestino, o que mostra um padrão de diversidade e de abundância variável.

Sabe-se também que a composição da microbiota é modulada principalmente por fatores externos, tais como dieta, uso de medicamentos e estilo de vida. (Gilbert *et al.*, 2018). Dado que os pacientes incluídos neste estudo passaram por tratamento cirúrgico digestivo, em termos, seria esperado detectar diferenças na composição da microbiota das amostras coletadas. Por outro lado, sabe-se também que a microbiota intestinal é extremamente resiliente na sua composição e que, apesar das perturbações induzidas pelos diferentes fatores externos e internos, ela tende a retornar ao seu estado de homeostase e, quando possível, à sua composição inicial. Dessa forma, a ausência de diferenças nas diversidades alfa e beta entre os grupos probiótico (+), probiótico (-) e controle pode ser parcialmente explicada pela resiliência da composição microbiana.

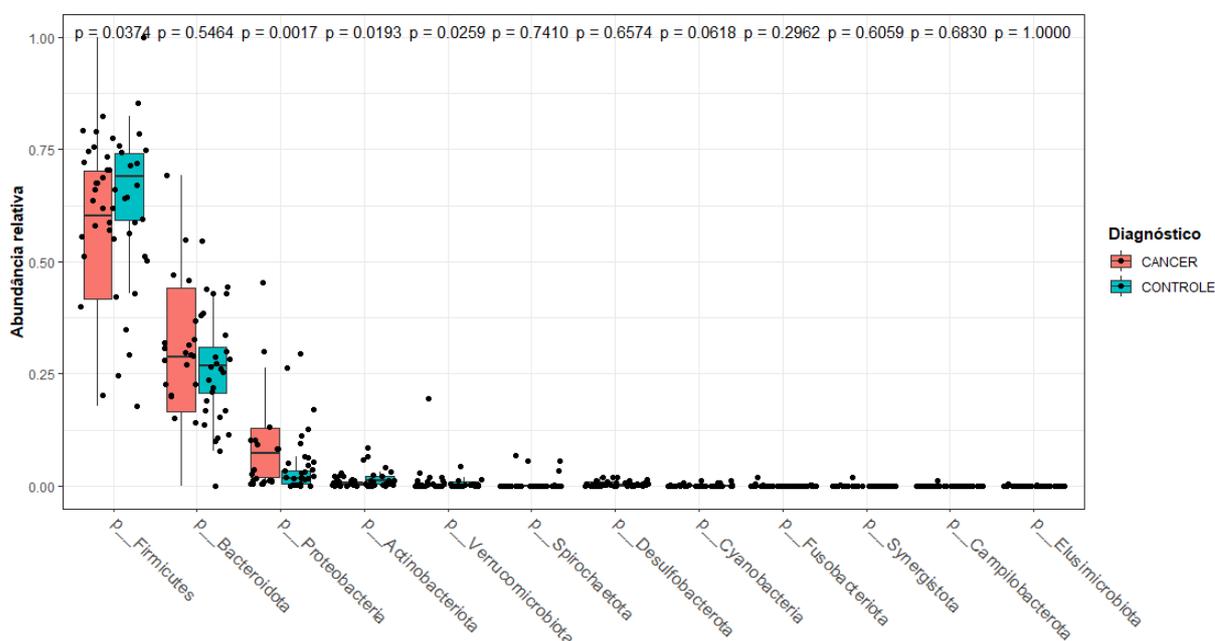
Virinder Sarhadi *et al.* (Sarhadi *et al.*, 2021) realizaram o sequenciamento do DNA fecal de indivíduos finlandeses, dos quais 29 pacientes com adenocarcinomas gástricos, 23 tumores com estromais gastrointestinais e 13 controles saudáveis. Não foi identificada uma diferença significativa para o índice de Shannon entre os grupos câncer *versus* controle, dados semelhantes aos desta pesquisa. No entanto é pertinente dizer que o número de indivíduos avaliados é uma limitação importante deste estudo.

Vale ressaltar que a heterogeneidade de resultados encontrados na literatura e neste estudo podem estar relacionadas com uma série de fatores que impactam em sua diversidade, como evidenciado por um estudo relevante proveniente do Consórcio de Microbioma Humano (Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome, 2012), 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, com o ambiente, com a genética do hospedeiro e com a exposição microbiana precoce, essa diversidade varia muito e está muito ligada ao tipo de nicho, ou seja, ao tipo de material (tecido/fecal) que está sendo avaliado.

10.5.3 Filos

Avaliando os filos, dentre os cinco mais abundantes, os que se destacam entre ambos os grupos foram os *Firmicutes*, com 56,4% no grupo câncer e 67,2% no grupo controle em média, seguidos de *Bacteroidetes*, com 30% no grupo câncer e 26% no grupo controle; o filo ***Proteobacteria*, com 10,4% no grupo câncer e 2,5% no grupo controle**; o filo *Actinobacteria*, com 0,9% no grupo câncer e 1,6% no grupo controle; e por fim um filo distinto, o filo *Verrucomicrobiota*, com menos de 1% em ambos os grupos (**Figura 20**); os demais filos representam menos de 0,9% da população microbiana presente nas amostras. Essa configuração de filos corrobora a literatura publicada sobre o tema (Zhang, Xinmei *et al.*, 2021), em que a proporção da relação normal de *Firmicutes/Bacteroidetes* está em torno de valores entre 1,3 a 3,2 em dados normais da microbiota.

Figura 20 – *Boxplot* da abundância relativa dos filos de grupos câncer e controle.



Fonte: O autor

No presente estudo, essa proporção foi de 1,88 no grupo câncer; e no grupo controle foi de 2,56 e, apesar de estar dentro da faixa considerada para microbiota saudável, quando voltado o olhar para a diferenciação dos principais filos da composição dos dados deste trabalho, vê-se uma leve disparidade entre os filos, de

sorte que *Bacteroidetes* estão em menor abundância no grupo controle frente ao filo *Firmicutes*, com 56,4% no grupo câncer e 67,2% no grupo controle (**Figura 20**).

Na distribuição de filós, achados importantes trazem à luz a mudança do padrão de microbiota no doente com câncer; resultados desta pesquisa demonstram um aumento da abundância do filo *Proteobacteria* no grupo câncer (10,4%) – dados que corroboram os achados de outro estudo (Shin; Whon; Bae, 2015a).

Sabendo que a microbiota saudável apresenta uma proporção aproximada de até no máximo 5% desse filo (Costello *et al.*, 2009; Shin; Whon; Bae, 2015b; Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome, 2012), pode-se inferir que no grupo avaliado houve uma drástica mudança influenciada por fatores tumorais e inflamatórios, o que é indicativo de uma comunidade microbiana instável, e tal fato configura o que chamamos de *disbiose*.

10.5.4 *Firmicutes*

Esta investigação mostrou que 100% dos gêneros bacterianos diferencialmente abundantes pertenciam a esse filo – o mais abundante em pacientes deste estudo –, sendo 56,4% no grupo câncer e 67,2 % no grupo controle.

Os gêneros bacterianos pertencentes a esse filo são habitantes gástricos típicos; e, embora os *Firmicutes* também sejam altamente prevalentes e dominantes nas partes inferiores do trato digestivo, deve-se enfatizar que os grupos taxonômicos normalmente encontrados em amostras gástricas (e no intestino delgado) pertencem predominantemente a *Bacilli* e a ordens *Negativicutes* (famílias *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Veillonellaceae*). Os residentes colônicos predominantes da ordem *Clostridiales* (membros de *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*) são escassos em amostras gástricas e, quando relatados, esses grupos são representados por gêneros atípicos para o trato GI inferior (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2020).

Importantes membros desse filo estavam também presentes nos resultados desse estudo, tais como *Negativibacillus*, *Streptococcus*, *Lachnospiraceae* etc., cujos dados são semelhantes aos desta pesquisa, confirmando a hipótese desse perfil de microbiota como preditor biológico para câncer gástrico.

10.5.5 *Bacteroidetes*

O segundo filo mais abundante nos resultados desta pesquisa foi o *Bacteroidetes*, com 30%, no grupo câncer e 26% no grupo controle, constituído principalmente de bactérias gram-negativas. Esse grupo de bactérias possui características fermentativas e com capacidade de modular o sistema imune de forma benéfica. No filo *Bacteroidetes*, dois gêneros bacterianos são prevalentes: *Bacteroides* e *Prevotella*, associados à manutenção da saúde intestinal e à prevenção de doenças. Apesar de as espécies do gênero *Bacteroides* serem mais frequentemente encontradas e mais abundantes, quando há presença de *Prevotella*, esse gênero se torna prevalente (Liang *et al.*, 2019). Comparativamente, os dados deste trabalho se mostram semelhantes às características da literatura científica, quando observada uma proporção maior dos gêneros *Bacteroides*.

10.5.6 *Proteobacteria*

Sobre o filo *Proteobacteria*, alterações importantes na rotina alimentar do ser humano estão intimamente ligadas a doenças. Um florescimento de *Proteobacteria* no intestino pode refletir uma estrutura instável da comunidade microbiana intestinal; essa estrutura instável pode ser observada em estados de ausência de doença (por exemplo, período neonatal) (Jakobsson *et al.*, 2014) e após cirurgia de *by-pass* gástrico (LIU *et al.*, 2013) e estados de doença (por exemplo, distúrbios metabólicos) (Fei; Zhao, 2013) e inflamação intestinal (Morgan *et al.*, 2012).

O rearranjo gastrointestinal pela cirurgia gástrica pode alterar o pH, o fluxo biliar e os hormônios intestinais – fatores que influenciam a abundância de *Proteobacteria* –, condição semelhante que ocorreu com os pacientes deste estudo com diagnóstico com câncer gástrico submetidos a gastrectomias, o que pode ainda ser correlacionado com a resposta imune pró-inflamatória, como foi demonstrado anteriormente nos dados relativos ao discreto aumento da calprotectina fecal.

Dentro desse filo, destaca-se uma espécie bacteriana chamada *Helicobacter pylori*, que é a maior responsável pelo aparecimento do CG, o qual é considerado um câncer associado à inflamação. Conhecida como fator de risco Classe I, a infecção por *H. pylori* pode estimular respostas imunes e inflamação, regular muitas vias de

sinalização e induzir acloridria, atrofia epitelial e displasia. Portanto a erradicação eficaz do *H. pylori* poderia prevenir o câncer gástrico (Doorakkers *et al.*, 2016).

10.5.7 Bactérias diferencialmente abundantes

Dos 199 gêneros identificados nas 36 amostras de material fecal, apenas 123 (62%) têm uma frequência média superior a 1% no grupo controle; e no grupo câncer a frequência foi de 70 gêneros (35%), o que indica que a composição da microbiota é dominada por poucos gêneros no grupo câncer. Os demais seis gêneros apresentaram frequências médias entre 0,00069% e 0,98%, sugerindo que, apesar do elevado número de gêneros presentes no material fecal, poucos estão em maior quantidade, sendo questionável se são capazes de exercer efeitos significativos no microambiente, além de estarem relacionados a um possível padrão disbiótico.

Figueiredo *et al.*, em 2020, (Figueiredo; Kramer, 2020) descreveram algumas das interações existentes entre os microrganismos, bem como entre esses e o hospedeiro humano, sendo as principais: cooperação, competição e predação. Na cooperação, microrganismos de diferentes espécies secretam metabólitos no meio, que são compartilhados entre os demais seres presentes naquele microambiente (Figueiredo; Kramer, 2020). Nesse processo uma adaptação mútua entre a microbiota e o hospedeiro parece ocorrer quando as células humanas liberam substâncias que beneficiam os microrganismos e favorecem seu crescimento. Em um cenário de competição, diferentes mecanismos podem coexistir como a disputa por nutrientes, interferência nas sinalizações entre bactérias ou, ainda, secreção de toxinas que inibem o crescimento ou a colonização de outros microrganismos. Por último, na predação, pode acontecer de a presença de uma determinada espécie impedir o crescimento de outra. Nesse sentido, as bactérias presentes em maior frequência na mucosa provavelmente têm maior capacidade de exercer influência sobre a comunidade por controlarem o crescimento de outras, bem como por produzirem maior quantidade de metabólitos favoráveis ao seu próprio desenvolvimento, culminando assim no aumento da sua frequência e no estabelecimento de vantagens competitivas no tecido.

Alguns gêneros bacterianos se mostraram diferencialmente abundantes quando comparados os grupos controle e câncer. Avaliou-se essa premissa também

comparativamente entre estes (controle e câncer) para citocinas inflamatórias e grau de Clavien-Dindo (complicações pós-operatórias) a fim de tentar traduzir as diferenças bacterianas entre oncológicos.

Para análise comparativa da microbiota entre pré, pós-operatório e controle, os pacientes foram classificados em três grupos para melhor análise estatística comparativa, pré-operatório (n = 23*), pós-operatório (n = 24) e controle saudável (n = 24) de acordo com a condição clínica de cada grupo. Por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível identificar que os gêneros bacterianos *Anaerofilum*, *Anaerostipes*, *Monoglobus*, *Nocardia*, *RF39*, *Tepidibacter* apresentaram diferença significativa entre os grupos em questão, considerando um valor *p* inferior a 0,05 (**Tabela 5**).

Inicialmente se fez uma análise comparativamente apenas entre os grupos (pré, pós-operatório e controle) para verificar se entre eles havia bactérias diferencialmente abundantes e que fossem correlacionadas na literatura científica.

Tabela 5 – Análise comparativa da microbiota intestinal dos pacientes estratificados classificados em pré-operatório (n = 11*), pós-operatório (n = 12) e controle saudável (n = 12) de acordo com a condição clínica de cada grupo por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Média da abundância relativa das sequências bacterianas (x10.000) seguida de desvio padrão entre parênteses (P valor < 0.05).

Gênero	CT	POS	PRE	P
<i>Anaerofilum</i>	1,73 (2,21)	0 (0)	0,16 (0,63)	0,039
<i>Anaerostipes</i>	80,53 (105,96)	19,86 (67,81)	52,71 (105,7)	0,047
<i>Monoglobus</i>	20,58 (37,85)	0,84 (2,97)	0,26 (0,99)	0,044
<i>Nocardia</i>	17,61 (15,57)	0,66 (1,98)	1,15 (3,16)	0,009
<i>RF39</i>	43,99 (83,95)	0,21 (1,03)	7,04 (22,08)	0,035
<i>Tepidibacter</i>	10,05 (18)	3,92 (11,15)	1,96 (5,49)	0,026

Os valores de *p* foram ajustados conforme o procedimento de Benjamin-Hoccheberg

*Foi excluída uma amostra por baixa qualidade do sequenciamento metagenômico.

Conforme se pode observar na Tabela, os seis gêneros bacterianos mais abundantes foram *Anaerofilum*, *Anaerostipes*, *Monoglobus*, *Nocardia*, *RF39*, *Tepidibacter*; os gêneros prevalentes foram o *Anaerofilum* (1,73%), *Anaerostipes* (52,71) e *Nocardia* (17,61%); a maioria deles são do filo *Firmicutes*; e apenas um, o *Nocardia*, é de filo diferente, que é o das *Actinobactérias*. *Firmicutes* estão relacionados com diversos processos em saúde e doença, tais como doenças autoimunes e câncer (Islam *et al.*, 2022).

Um dos gêneros achados nos dados deste estudo foi o *Anaerofilum*, pertencente ao filo *Firmicutes*; ele foi descrito pela primeira vez por Zenner em 1996 (Zellner *et al.*, 1996) e se mostrou reduzido nos dados deste trabalho quando avaliado o grupo câncer tanto no pré quanto no pós-operatório e aumentado no grupo controle (p -valor 0,0004) (**Figura 21-A**).

O *Anaerofilum* é um gênero pouco relacionado ao câncer; na descrição da literatura, é encontrado em proporção reduzida nos casos de doença de Graves (Cao *et al.*, 2023) e em casos de depressão (Barandouzi *et al.*, 2020a), bem como em atrofia muscular espinhal – nesta em quantidade reduzida (Feng, Yijie *et al.*, 2023).

Em relação ao gerenciamento da obesidade e os períodos do sono no relógio cronológico, recentemente foram identificadas três bactérias relacionadas à obesidade; dentre elas o gênero da discussão deste trabalho, o *Anaerofilum*, a ordem *Enterobacteriales* e outra de sua família, a *Enterobacteriaceae*, que contribuem para que se torne uma pessoa notívaga. Especificamente, o gênero *Anaerofilum* pertence aos *Firmicutes* e é conhecido por integrar a “microbiota obesogênica” (Yue *et al.*, 2023).

Anaerofilum também está reduzido quando avaliados os perfis do metabolismo fecal do triptofano em pacientes com câncer colorretal, o que mostra assim seu papel na regulação de vias metabólicas do tumor (Sun *et al.*, 2020).

Outro gênero muito abundante (80%) nos dados do presente estudo é o *Anaerostipes*, que também pertence ao filo *Firmicutes*, que aqui se mostrou aumentado nos grupos controle (p -valor 0,000066) e pré-operatório (p -valor 0,0053); observou-se, todavia, que no grupo pós-operatório houve redução desse gênero.

É um importante produtor de AGCC (ácido graxo de cadeia curta), especialmente o butirato, que é um importante metabólito nas diversas vias metabólicas celulares, inclusive de supressão tumoral (Singh, Vineet *et al.*, 2023a).

Além disso, estudos relatam que a abundância de *Anaerostipes* diminuiu significativamente em indivíduos com diabetes tipo 2 de origem africana e europeia (Doumatey *et al.*, 2020; Zeevi *et al.*, 2019). Vários estudos mostraram que bactérias desse gênero são capazes de interagir com outros micróbios com diversas capacidades catabólicas que produzem lactato (Belzer *et al.*, 2017; Duncan; Louis; Flint, 2004). Atualmente existem quatro espécies conhecidas de *Anaerostipes*, incluindo *A. caccae*, *A. rhamnosivorans*, *A. hadrus* e *A. butyraticus*. As espécies desse gênero não são apenas capazes de utilizar uma ampla gama de carboidratos, mas também lactato e acetato para a butirogênese. Enquanto *A. hadrus* pode usar apenas

d-lactato, *A. caccae* e *A. rhamnosivorans*, as demais são capazes de usar os estereoisômeros de L-lactato, que são amplamente produzidos no trato intestinal humano e acumulados em pacientes com distúrbios gastrointestinais e até câncer (Hove; Nordgaard-Andersen; Mortensen, 1994). *A. rhamnosivorans* está entre as espécies mais versáteis do gênero e é a única que tem a capacidade de fermentar a ramnose da dieta em butirato.

Estudos recentes sugeriram que a bactéria intestinal *Anaerostipes* pode conferir efeitos protetores contra tipos específicos de câncer. Notavelmente, em modelos murinos, é observada uma associação negativa entre a abundância de *Anaerostipes* e a incidência de câncer colorretal; e acredita-se que esses mecanismos de proteção estejam ligados à produção de butirato e ao aumento da função da barreira intestinal (Singh, Vineet *et al.*, 2023a), exercendo também papel inibitório na formação do colangiocarcinoma intra-hepático (Chen, Zhitao *et al.*, 2023). Notavelmente os dados deste trabalho são semelhantes a esses quando observada a comparação entre grupo controle e grupo pós-operatório, com significância estatística forte (p-valor 0,00061) (**Figura 21-B**).

Anaerostipes foi relacionado em estudo com pacientes diagnosticados com câncer de pâncreas, e nestes foi observado uma redução desse gênero; também foi citado como marcador biológico para fator de proteção que se correlacionou positivamente com o tempo de sobrevivência desses indivíduos (Pourali *et al.*, 2024).

Nesse contexto outro gênero bacteriano que se sobressaiu estatisticamente foi a *Nocardia*, cujo gênero é nomeado em homenagem a Edmond Isidore Etienne Nocard (1850–1903), um veterinário e microbiologista francês que descobriu a bactéria em 1888, em um caso de farsa bovina. Ele chamou essa bactéria filamentosa e ramificada de *Streptothrix farcinica* (do grego *streptós* – “torcido”; e *thrix* – “cabelo”). Farcy (*farcin* em francês antigo) é uma forma de mormo cutâneo, caracterizada por inchaço superficial dos linfonodos e formação de nódulos ulcerativos sob a pele (latim tardio *farcīminum* – “mormo”; do latim *farcīmen* – “uma salsicha”; de *farcīre* “recheiar”) (Opperman, 2020).

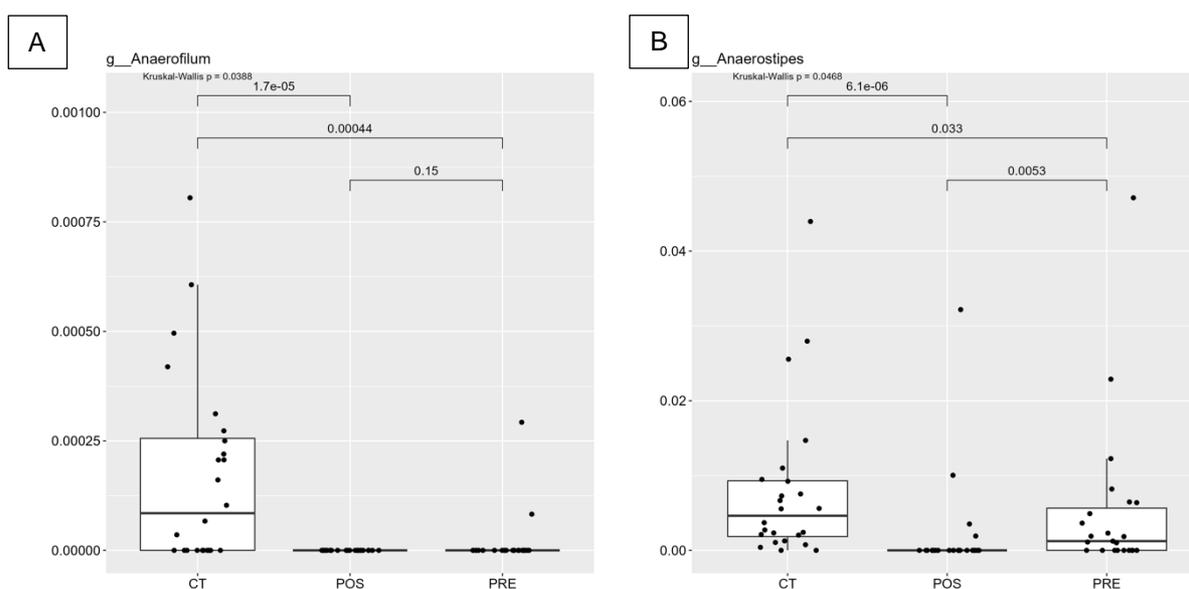
Blanchard renomeou o organismo como *Nocardia asteroides* em 1896. Trabalhos taxonômicos adicionais em 1962 resultaram em *Nocardia asteroides* substituindo *Nocardia farcinica* como espécie-tipo do gênero *Nocardia* (Opperman, 2020).

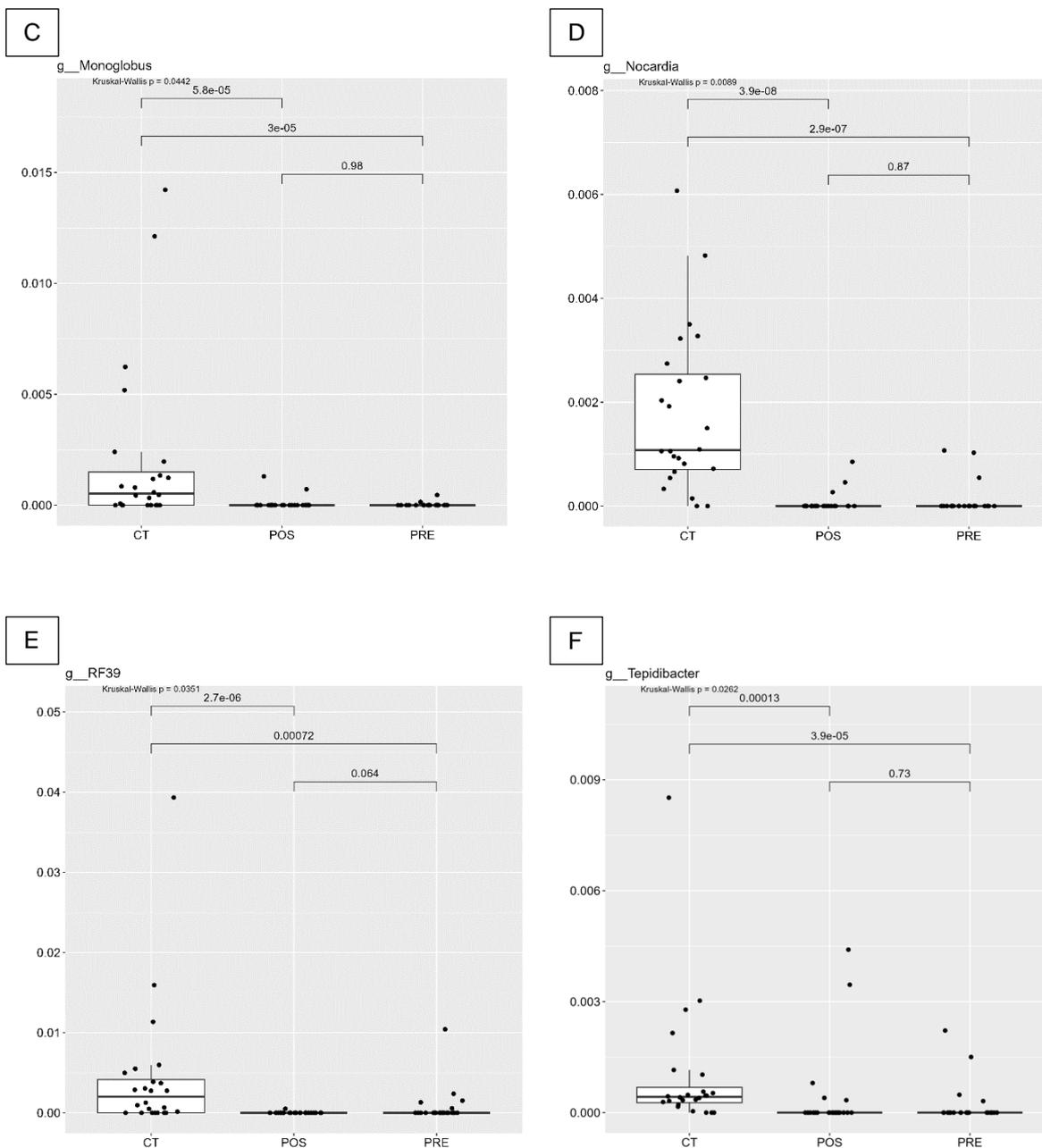
As bactérias afiliadas ao gênero *Nocardia* são *actinomicetos*, ou seja, pertencentes ao filo *Actinobacteria*; são aeróbias e gram-positivas amplamente

encontradas em *habitats* aquáticos e terrestres. Como patógenos ocasionais, vários deles causam doenças infecciosas chamadas “nocardioses”, que afetam os pulmões, o sistema nervoso central, os tecidos cutâneos e outros. Além disso, os membros do gênero *Nocardia* apresentam uma enorme versatilidade metabólica. Por um lado, muitos metabólitos secundários foram isolados de membros desse gênero, que exibe diversas atividades biológicas como atividades antimicrobianas, antitumorais, antioxidantes e imunossupressoras. Por outro lado, muitas espécies são capazes de degradar ou de converter hidrocarbonetos tóxicos alifáticos e aromáticos, polímeros naturais ou sintéticos e outros poluentes ambientais generalizados (Luo; Hiessl; Steinbüchel, 2014).

Nos dados deste trabalho esse gênero mostrou-se aumentado no grupo controle e reduzido nos grupos pré e pós-operatório (p-valor 0,0089), o que demonstra desequilíbrio em um gênero de resposta positiva para saúde intestinal conforme relatado por Luo em 2014 (Luo; Hiessl; Steinbüchel, 2014) (**Figura 21-D**).

Figura 21 – Análise comparativa de bactérias diferencialmente abundantes nos grupos controle e câncer (no pré e pós-operatório), onde: A) Média da abundância relativa de *Anaerofilum* (p-valor 0,038); B) Média da abundância relativa de *Anaerostipe* (p-valor 0,046); C) Média da abundância relativa de *Monoglobus* (p-valor 0,044); D) Média da abundância relativa de *Nocardia* (p-valor 0,008); E) Média da abundância relativa de RF-39 (p-valor 0,035); F) Média da abundância relativa de *Tepidibacter* (p-valor 0,026). Realizado teste para variáveis não paramétricas de Kruskal-Wallis.





Para que se pudessem visualizar de forma mais ampla os gêneros diferencialmente abundantes relacionados à resposta do uso de probiótico, houve a decisão de então separar os grupos comparando apenas os grupos probiótico (+) e probiótico (-) (**Tabela 6**).

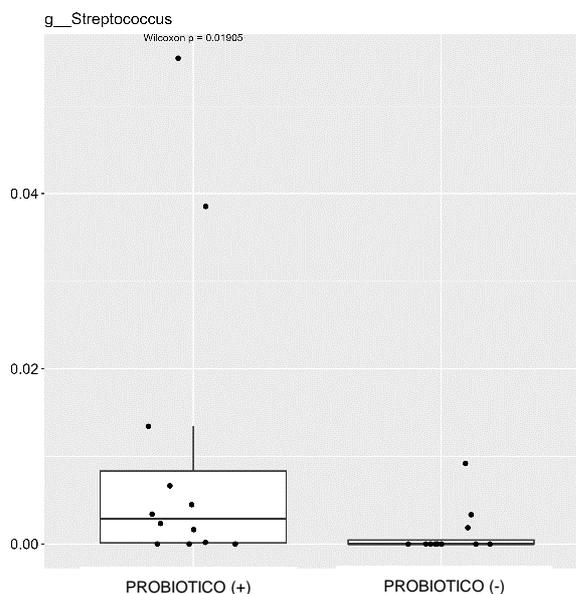
Tabela 6 – Análise comparativa da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em (probiótico (+) (n=12) e (probiótico (-) (n=12) por meio de teste não paramétrico de Wilcoxon. Média da abundância relativa das sequências bacterianas (x10.000) seguida de desvio padrão entre parênteses (P valor < 0.05).

Gênero	Probiótico (+)	Probiótico (-)	P
<i>Butyricimonas</i>	3,97 (9,86)	32,17 (47,12)	0,022
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0 (0)	5,67 (14,86)	0,037
<i>Negativibacillus</i>	33,69 (73,33)	1,46 (5,05)	0,041
<i>Streptococcus</i>	105,1 (178,33)	11,99 (27,29)	0,019
<i>UCG-003</i>	11,8 (21,49)	42,54 (51,96)	0,048

Nota: Os valores de *p* foram ajustados conforme o procedimento de Benjamin-Hoccheberg.

Esses dados identificaram maior abundância do gênero *Streptococcus* (105,1%) no grupo probiótico (+), um gênero do tipo gram-positivo do filo *Firmicutes*. Discutir-se-á apenas esse gênero, pois foi o mais significativo (*p*-valor 0,019) (**Figura 22**).

Figura 22 – Média da abundância relativa de *Streptococcus* (*p*-valor 0,0019).



Quanto ao potencial carcinogênico do *Streptococcus*, tem sido relatada a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 pelo hospedeiro (dados que serão discutidos no próximo tópico) como um mecanismo de defesa ante a presença de espécies como *Streptococcus bovis* e *S. gallolyticus*, mas em longo prazo pode gerar a produção de algumas moléculas de óxido nítrico e radicais livres (superóxido, peroxinitritos,

radicais hidroxila e radicais alquilperoxi), que têm potencial mutagênico no material genético do hospedeiro (Abdulmir; Hafidh; Abu Bakar, 2011).

A maioria das espécies de *Streptococcus* não são prejudiciais, no entanto estudos recentes sugerem sua associação ao câncer gástrico. Em particular, a pesquisa de Zi *et al.* em 2022 descreveu que o *Streptococcus* é prevalente na cavidade oral, no estômago e no intestino de pacientes com câncer gástrico e aumenta nos tecidos tumorais, o que sugere que pode ser a bactéria patogênica subjacente responsável por essa neoplasia (Zi *et al.*, 2022a).

Esse mesmo gênero foi avaliado em outro estudo chinês 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 daquele país. Os autores também identificaram que esse gênero está mais abundante no tecido tumoral (Chen, Xiao-Hui *et al.*, 2019). É importante dizer que nesse mesmo trabalho foi vista uma interação simbiótica entre *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Dialister* e *Prevotella* no grupo câncer, fato que pode indicar um papel importante desses gêneros na manutenção do microambiente tumoral (Chen, Xiao-Hui *et al.*, 2019).

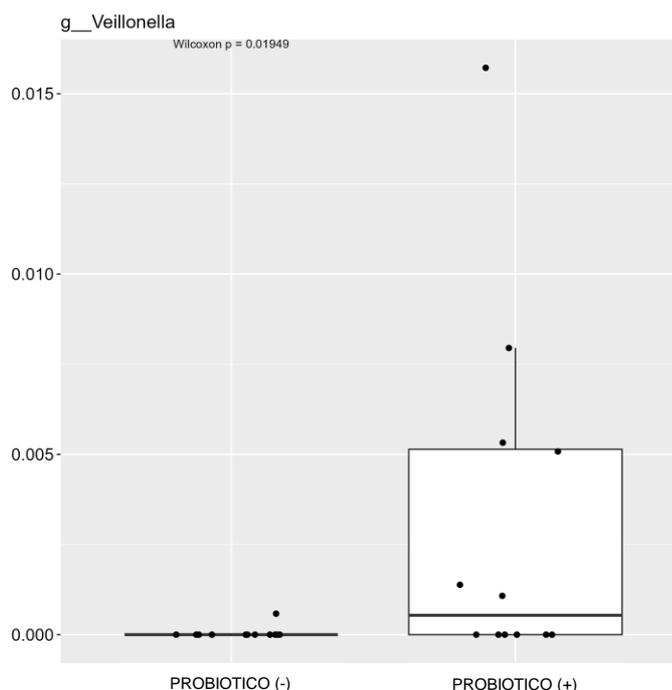
Outro trabalho publicado em 2021 avaliou a microbiota salivar em pacientes em diferentes estágios histológicos progressivos de carcinogênese gástrica, identificando também um maior enriquecimento dos gêneros pró-inflamatórios *Streptococcus* e *Corynebacterium* na microbiota oral de indivíduos com câncer gástrico, quando comparada a portadores de gastrite superficial e gastrite atrófica (Huang *et al.*, 2021).

Importante salientar que o gênero *Streptococcus* nos dados do presente estudo estão aumentados no grupo probiótico (+), o que demonstra uma possível associação do uso de probióticos com esse aumento e sugere o potencial patogênico desse gênero para o câncer gástrico, mesmo frente à intervenção com probióticos (Zi *et al.*, 2022b); pode-se ainda afirmar que bactérias do biofilme oral, tais como *Streptococcus* e *Veillonella*, estão sendo apontadas como biomarcadores para câncer gastrointestinal (Kashyap *et al.*, 2022) por possível translocação bacteriana via *Leaky Gut*.

Outro achado foi o gênero *Veillonella*, também do filo *Firmicutes*, que foi um dos gêneros mais abundantes no grupo probiótico (-) (p -valor 0,019) (**Figura 23**). Embora estejam mais presentes no grupo probiótico (+), foi relatado que esse gênero tem uma aparente relação sinérgica com *Streptococcus*, que também pertence ao mesmo filo bacteriano. Há relatos na literatura de pacientes com diagnóstico de câncer

de pulmão que apresentaram enriquecimento nas vias aéreas inferiores com bactérias orais comensais desses dois gêneros (*Veillonella* e *Streptococcus*), que estão associadas à regulação positiva das vias de proliferação de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Além dessa associação, experimentos *in vitro* confirmaram esses mecanismos, que expõem as células epiteliais das vias aéreas a algumas dessas bactérias (Tsay *et al.*, 2018). Essa relação de cooperação entre esses gêneros pode ocorrer porque *Streptococcus*, que é um gênero de bactérias anaeróbicas facultativas, pode fermentar açúcares e gerar lactato, que por sua vez pode ser fermentado por espécies de *Veillonella* que produzem propionato, acetato, CO₂ e H₂ (Lee, Joo-Young *et al.*, 2021).

Figura 23 – Média da abundância relativa de *Veillonella* (p-valor 0,0019).

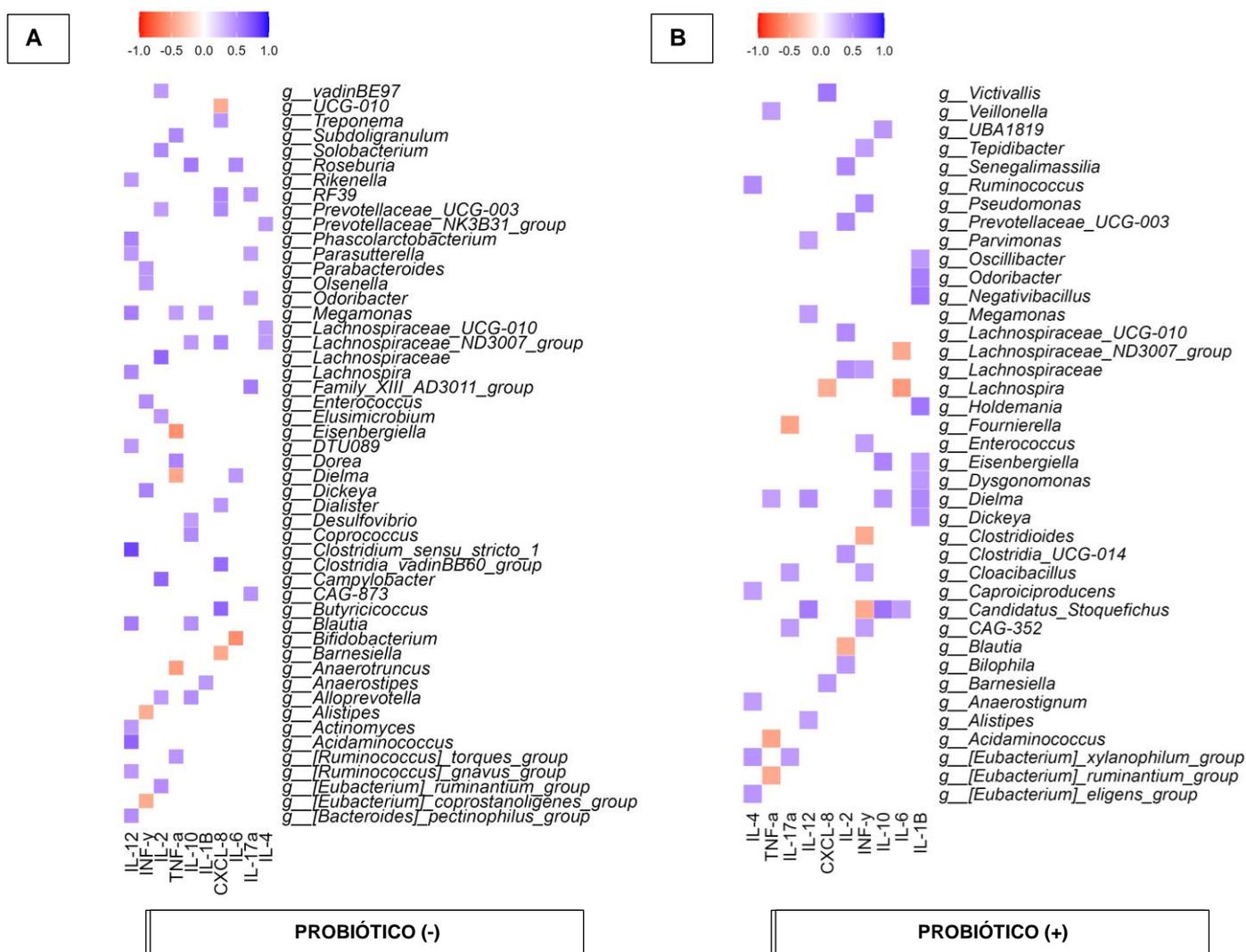


10.5.8 Bactérias diferencialmente abundantes *versus* citocinas inflamatórias

Utilizaram-se os mesmos participantes classificados em pré-operatório (n = 23), pós-operatório (n = 24) e controle saudável (n = 24) de acordo com a condição clínica de cada grupo. A microbiota desses pacientes foi analisada a fim de identificar se havia diferenças significativas entre os grupos pré-determinados e quais gêneros bacterianos da microbiota intestinal deles estavam correlacionados com as citocinas INF- γ , CXCL-8, IL-1b, TNF-a, IL-6, IL-17a, IL-10, IL-4 e IL-12.

Por meio da análise de correlação de *Spearman* considerando valor $p < 0.05$, 50 gêneros bacterianos no grupo probiótico (-) no pré-operatório (**Figura 24-A**) e 39 gêneros bacterianos no grupo probiótico (+) no pós-operatório (**Figura 24-B**) apresentaram correlação significativa com a variação das citocinas nos pacientes. No caso dos pacientes em pré-operatório, 21 gêneros bacterianos ao total apresentaram correlação significativa com a variação das citocinas e as citocinas IL-12 e CXCL-8 no grupo probiótico (-); e 23 gêneros bacterianos suscitarão correlação significativa para as citocinas IL-1b, IL-2 e INF-y no grupo probiótico (+). Essas foram as maiores correlações significativas (**Figura 24**).

Figura 24 – Gêneros bacterianos da microbiota intestinal dos pacientes que apresentaram correlação significativa com a variação das citocinas nos pacientes (valor $p < 0,05$), onde: **A**) *Heatmap* de correlações significativas entre bactérias e citocinas no grupo probiótico (-); **B**) *Heatmap* de correlações significativas entre bactérias e citocinas no grupo probiótico (+). Teste da análise: correlação de Spearman.



Com base nos resultados apresentados até aqui, verifica-se que alguns gêneros tiveram forte correlação com algumas citocinas; para IL-12, foram duas correlações positivas fortes, para os gêneros *Acidaminococcus* (rho: 0,666 e *p*-valor 0,0005) e *Clostridium sensu stricto_1* (rho 0,79790 e *p*-valor 0,00001).

Acidaminococcus é um gênero do filo *Firmicutes* cujos membros são diplococos anaeróbicos que podem usar aminoácidos como única fonte de energia para o crescimento (Jumas-Bilak *et al.*, 2007). Esse gênero também foi descrito em estudo de outro tipo de adenocarcinoma gastrointestinal (Hua *et al.*, 2022). Outro estudo trouxe à luz a *Acidaminococcus intestini*, que comparou grupos caso e controle e demonstrou que o gênero foi maior nos carcinomas do que nos controles tendo sido negativamente correlacionado com os índices dietéticos (carne vermelha e ferritina sérica) (Feng, Qiang *et al.*, 2015), o que o torna parte importante de uma espécie de assinatura microbiana em câncer gastrointestinal (Hua *et al.*, 2022).

Outro estudo taiwanês demonstrou que o gênero *Acidaminococcus* está associado ao carcinoma hepatocelular tratado com imunoterapia anticâncer, comparando respondedores anti-PD-1/anti-PD-L1 in; em alguns casos em combinação com inibidores da angiogênese e em pacientes com doença controlada (resposta objetiva ou DP para ≥ 16 semanas) (Shen *et al.*, 2021). No presente estudo esse gênero teve correlação positiva com IL-12, o que traduz uma resposta inflamatória aumentada via células NK, que foram estimuladas pela IL-12 (Morvan; Lanier, 2016).

O fato é que estudos mostram que *Acidaminococcus* está relacionado com menor produção de AGCC (butirato, propionato, acetato) e com a produção de metabolitos tóxicos como o amoníaco (Koppel *et al.*, 2017), o que talvez justificaria a sua relação positiva com a maior expressividade da IL-12 pró-inflamatória (Patrone *et al.*, 2016).

Outro gênero diferencialmente abundante correlacionado com IL-12 é o *Clostridium sensu stricto_1*, cujos dados achados indicam sua participação nos processos inflamatórios relacionados à colite ulcerativa com papel protetor modulando e beneficiando a microbiota do hospedeiro (Ma *et al.*, 2022).

Outro estudo avaliou o potencial simbiótico de *Clostridium sensu stricto_1* no câncer com diversas bactérias, incluindo a *H. Pylori*, que é atualmente a espécie mais relacionada ao câncer gástrico (Nikitina *et al.*, 2023).

Corroborando os dados desta pesquisa, *Clostridium sensu stricto_1* foi diferencialmente abundante e teve correlação positiva com a IL-12, que está ligada à

resposta inflamatória tanto local (tumoral), quanto sistêmica intestinal (GALT).(Singh, Vineet *et al.*, 2023b).

Ainda outro estudo demonstrou o mecanismo de ação de *Clostridium sensu stricto_1*, que, por ser um importante produtor de AGCC, tem papel fundamental na manutenção da barreira intestinal, otimizando a função colônica (Li, Xiaoqin *et al.*, 2023).

Quanto à citocina CXCL-8, apenas um gênero bacteriano mostrou correlação forte, o *Butyricoccus*, que foi descrito pela primeira vez em 2010 (Eeckhaut *et al.*, 2008).

Estudos avaliaram sua relação com câncer; por exemplo, com câncer colorretal (CCR) e observaram que existe um estímulo de produção de butirato, que é um ácido graxo de cadeia curta (AGCC), responsável por diversas respostas metabólicas e inflamatórias, inclusive estimulando a apoptose de células neoplásicas em modelos murinos (Chang, Shih-Chang *et al.*, 2020).

Além disso, outros estudos descobriram que *Butyricoccus* associado a outros gêneros bacterianos, tais como *Enterococcus*, *Lachnoclostridium*, *Tyzzarella_3*, *Roseburia*, *Dorea*, *Halomonas* e *Burkholderiales_unclassified*, estava associado à infecção por *H. Pylori* e câncer gástrico (Miao *et al.*, 2022), sendo também apontado como possível marcador em câncer gastrointestinal (Kong; Cai, 2019).

Adicionalmente, outro gênero foi correlacionado; dessa vez, com a citocina IL-2 no grupo pós-operatório, a *Lachnospiraceae*, pertencente ao filo *Firmicutes*; as *Lachnospiraceae* são uma família de bactérias obrigatoriamente anaeróbicas e variavelmente formadoras de esporos da ordem *Eubacteriales*, que fermentam diversos polissacarídeos vegetais em ácidos graxos de cadeia curta (butirato, acetato) e álcoois (etanol) (Boutard *et al.*, 2014).

Estudos recentes apontam que a família *Lachnospiraceae* facilita a função de vigilância imunológica das células T CD8+ e controla a progressão do câncer gastrointestinal (Zhang, Xusheng *et al.*, 2023).

No que tange à correlação de gêneros bacterianos com a interleucina-1b (IL-1b), dois gêneros tiveram correlação positiva forte no momento pós-operatório, *Negativibacillus* e *Holdemania*. Como já discutido anteriormente, a IL-1b é pró-inflamatória e parece estar relacionada com câncer gástrico por meio de alguns polimorfismos (Ruzzo *et al.*, 2005).

Esse gênero foi isolado pela primeira vez em 2016 pela equipe do Dr. Ricaboni na França (Ricaboni *et al.*, 2016); é pouco descrito pela literatura científica, com casos relacionados à colite ulcerativa, em que esteve aumentado (Gryaznova *et al.*, 2021).

Apesar de a sua correlação ter sido avaliada como forte com a interleucina 1b, este estudo não encontrou dados robustos sobre seu papel no aumento ou na redução da IL-1b e seu significado clínico.

Outro gênero com correlação positiva para IL-1b foi a *Holdemanina*, que faz parte do filo *Firmicutes* e foi descrita pela primeira vez em 1977, a partir do grupo *Eubacterium S14* (Willems *et al.*, 1997).

Pouco descrita nos casos de câncer, esse gênero se comporta de maneira diferencialmente abundante em alguns casos, tais como nos transtornos de ansiedade e depressão (Barandouzi *et al.*, 2020b), nos casos de melanoma associado à resposta do imunoterápico (Frankel *et al.*, 2017) e em casos de câncer colorretal quando associado a outro gênero chamado *Fusobacterium*, da espécie *Nucleatum* (Kharofa *et al.*, 2023).

É digno de nota que as espécies mais abundantes nos achados deste trabalho pertencem ao filo *Firmicutes* e que a maioria das bactérias pertencentes a ele possui uma parede celular gram-positiva. Algumas delas (*micoplasmas*) carecem de paredes celulares, motivo pelo qual não sofrem coloração pela técnica de Gram. Além disso, carecem da segunda membrana encontrada na maioria das bactérias gram-negativas (Guerrero-Preston *et al.*, 2016).

Importante ressaltar que esse filo constitui cerca de 60-80% das bactérias pertencentes à microbiota intestinal saudável, tendo assim grande influência nos fatores orgânicos e metabólicos de corpo humano (Eid *et al.*, 2017). Esses dados têm grande compatibilidade com o presente estudo quando dado enfoque para os gêneros bacterianos que foram correlacionados com citocinas importantes citadas no decorrer da discussão. Notou-se que 100% deles pertenciam ao filo *Firmicutes*.

Por fim, essas correlações – chamadas positivas e observadas neste trabalho – demonstram que, quando o gênero bacteriano se eleva, a citocina também aumenta, e vice-versa. Nos resultados do presente estudo, foi observado que parece existir um padrão de correlações positivas nos pacientes (**Figura 24 A e B**), o que aponta uma tendência específica da modulação do perfil inflamatório dependente de alguns gêneros bacterianos. Dados semelhantes foram observados em estudo de perfil citocínico em pacientes com câncer gástrico no México (Villagran *et al.*, 2021b).

10.5.9 Bactérias diferencialmente abundantes em pacientes com muitas complicações

Para avaliar se haveria relação da microbiota desses pacientes entre os casos que complicaram mais, no intuito de conseguir entrever esses pormenores, estratificaram-se os pacientes em dois grupos conforme a classificação de complicações cirúrgicas de Clavien-Dindo, sendo eles MC (pacientes com muitas complicações) e PC (pacientes com poucas complicações). A microbiota desses pacientes foi analisada por meio de testes não paramétricos de Wilcoxon considerando um valor p inferior a 0.05 (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Análise comparativa da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em MC (pacientes com muitas complicações) e PC (pacientes com poucas complicações) conforme a classificação de complicações cirúrgicas de Clavien-Dindo por meio de teste não paramétrico de Wilcoxon. Média da abundância relativa das sequências bacterianas (x10.000) seguida de desvio padrão entre parênteses (P valor < 0.05).

Gênero	MC	PC	P
<i>Alistipes</i>	19,34 (33,96)	55,96 (65,14)	0,005318
<i>Alloprevotella</i>	120,49 (246,84)	351,77 (493,31)	0,00439
<i>Anaerostipes</i>	30,58 (97,26)	43,82 (77,04)	0,032072
<i>Butyricimonas</i>	4,7 (11,45)	29,61 (38,79)	0,00079
<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	179,92 (265,3)	515,15 (696,91)	0,016228
<i>Coprococcus</i>	68,42 (121,24)	126,59 (169,83)	0,04857
<i>Desulfovibrio</i>	20,03 (30,39)	52,95 (47,32)	0,004934
<i>Dorea</i>	23,07 (38,41)	87,99 (143,28)	0,036885
<i>Holdemanella</i>	61,31 (188,3)	144,1 (347,72)	0,018023
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0 (0)	3,58 (11,95)	0,01293
<i>Izemoplasmatales</i>	1,63 (6,07)	9,76 (22,8)	0,01443
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	70,7 (129,8)	135,93 (188,67)	0,034893
<i>Lachnospiraceae_UCG-004</i>	34,03 (54,81)	86,99 (115,39)	0,049653
<i>Odoribacter</i>	4 (9,95)	13,85 (15,79)	0,00894
<i>Phascolarctobacterium</i>	10 (17,32)	23,82 (27,19)	0,044354
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	4,15 (11,28)	29,23 (39,74)	0,000414
<i>Prevotellaceae_UCG-003</i>	23,21 (67,8)	27,81 (46,62)	0,03543
<i>vadinBE97</i>	0,72 (1,91)	14,22 (35,8)	0,021133
<i>Weissella</i>	0 (0)	6,66 (19,79)	0,03376

Os valores de p foram ajustados conforme o procedimento de Benjamin-Hoccheberg. Onde: MC grupo muitas complicações; PC grupo poucas complicações e P, valor de p .

Após análise minuciosa dos resultados, puderam-se identificar três gêneros muito relacionados com os resultados deste trabalho de sorte que se verificou que

Alloprevotella e *Christensenellaceae_R-7_group* são as com maior quantitativo no grupo muitas complicações e aparecem com alta incidência entre os pacientes – (19/24); e o gênero bacteriano *Lachnospiraceae_NK4A136_group* com (13/24), que tem baixa incidência entre os pacientes. Essa compreensão dos dados deste estudo traz à luz inferências que podem estar relacionadas com o fato de a gastrectomia resultar em alterações significativas na microbiota intestinal: maior abundância de bactérias da cavidade oral, bactérias aerotolerantes e bactérias transformadoras da bile, perfazendo assim um ambiente proveniente de alta permeabilidade intestinal; e essas alterações no microbioma estão relacionadas à saúde e à resposta cirúrgica (Liang *et al.*, 2019).

Estudos mostram que o impacto da gastrectomia na abundância bacteriana e na diversidade alfa parece ser um efeito de longo prazo da cirurgia, uma vez que essas alterações não foram observadas por Liang *et al.* (Lin *et al.*, 2018b).

O primeiro gênero bacteriano mais abundante foi a *Christensenellaceae_R-7_group* (*p*-valor 0,01), pertencente ao filo *Firmicutes*; sua redução está relacionada a diversas doenças, tais como câncer colorretal (Zouiouich *et al.*, 2022); no câncer de cavidade oral, surge como biomarcador para este, tendo em vista o gênero ser comum ao microbioma oral (Liu, Xinpeng *et al.*, 2024); também está nas doenças pancreáticas (Poudel *et al.*, 2021) e na obesidade (Waters; Ley, 2019).

A família *Christensenellaceae* também está relacionada a um estado saudável possivelmente pelo seu importante papel na influência da morfologia ileal, por ser forte produtora de AGCC (butirato) (Cui, Guanghui *et al.*, 2023). Esse parece ser o mecanismo subjacente ao seu efeito causal (McCormack *et al.*, 2017) encontrado também em vários outros contextos de doenças, incluindo obesidade e doença inflamatória intestinal (Waters; Ley, 2019).

No presente estudo ela se manteve reduzida no grupo com muitas complicações, o que denota que sua ausência ou sua redução interferem diretamente na homeostase intestinal.

O segundo gênero mais abundante dentre os grupos foi a *Alloprevotella* (*p*-valor 0,004), do filo *Bacteroidetes*, importante bactéria do biofilme oral, a qual, quando encontrada no material fecal de humanos, direciona à patogenia da permeabilidade intestinal (*Leaky Gut*) (Hollander; Kaunitz, 2020); ela também foi descrita como forte marcador biológico oral para lesões pré-malignas de câncer gástrico, o que fornece um dado que corrobora fortemente os achados desta pesquisa, na qual pacientes com

muitas complicações tiveram níveis bastante elevados dessa bactéria (Liu, Yuting *et al.*, 2023).

Outro achado deste estudo foi o gênero *Lachnospiraceae_NK4A136_group* (p -valor 0,03), que esteve presente em mais de 50% das amostras e pertence ao filo *Firmicutes* e à família *Lachnospiraceae*, importante produtor de AGCC, dita como bactéria mantenedora da saúde intestinal por produzir butirato; ela está relacionada à manutenção da integridade da barreira intestinal, inibindo assim o Leaky Gut (Ma *et al.*, 2020).

As *Lachnospiraceae* são uma família de bactérias anaeróbicas da ordem *Clostridiales* dentro do filo *Firmicutes* e incluem espécies previamente identificadas como *Clostridium cluster XIVa*. Essa família é abundante na microbiota humana adulta imperturbável (Sorbara *et al.*, 2020; Lopetuso *et al.*, 2013).

Nos resultados deste trabalho, esse gênero se encontra reduzido no grupo muitas complicações, o que corrobora os dados descritos acima em outros estudos que relacionam *Lachnospiraceae_NK4A136_group* com saúde intestinal por sua produção de AGCC (butirato); comparativamente o grupo “poucas complicações” possivelmente obteve efeito protetor por apresentar maior abundância desse gênero.

Outro estudo relacionou *Lachnospiraceae_NK4A136_group* com a carcinogênese em câncer gástrico. A abundância baixa desse gênero em detrimento de outros como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Veillonella* mostra que a disbiose é muito presente e se relaciona com progressão tumoral (Park *et al.*, 2022), inclusive em lesões pré-malignas (Zhang, Xinmei *et al.*, 2021).

Recentemente um estudo mostrou que a família *Lachnospiraceae* também tem relação íntima com a progressão tumoral em câncer colorretal; durante o estudo que analisou as bactérias intratecidos da família *Lachnospiraceae*, observou-se que essas bactérias facilitam a função de vigilância imunológica das células T CD8 + e controlam a progressão do câncer colorretal (Zhang, Xusheng *et al.*, 2023).

Em última análise, os dados respondem às hipóteses sobre o perfil da microbiota na população com câncer estudada pelo presente trabalho e demonstram existir um perfil muito semelhante ao dos estudos publicados sobre a mesma doença, além de apontarem gêneros específicos como biomarcadores, inclusive para lesões pré-malignas, dentro do contexto que envolve o aumento da permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana, capaz de apresentar no material fecal espécies pertencentes à microbiota oral.

10.6 Conclusão

Observou-se que algumas variáveis clínicas tiveram participação significativa nas alterações da composição corporal/muscular de pacientes submetidos a gastrectomias por câncer gástrico. Pode-se afirmar pontualmente que CMB, AF e especialmente calprotectina fecal se correlacionaram com a literatura científica sobre o estado clínico-nutricional dos indivíduos estudados.

Quanto à microbiota intestinal, observou-se que existe uma tendência de mudança do perfil microbiano aos acometidos por câncer gástrico, configurando assim o que se denomina de *disbiose*. Não foi possível afirmar que o uso de probióticos modulou a microbiota intestinal de pacientes com câncer gástrico, mesmo quando comparados os momentos pré e pós-operatórios. Bactérias diferencialmente abundantes na população estudada, tais como *Streptococcus*, *Alloprevotella* e *Christensenellaceae_R-7_group*, podem ser apontadas como marcadores biológicos para câncer gástrico nessa população.

No que se refere às citocinas e seu perfil inflamatório, observou-se que existe uma leve diferença da resposta inflamatória quando comparados os grupos controle e câncer, porém sem efeitos quando observados quanto ao uso de probióticos.

No que tange ao uso de probióticos frente à redução de complicações cirúrgicas no pós-operatório, não se observaram resultados positivos na redução de complicações.

Considera-se, pois, que o tempo de uso de probióticos deve ser maior para que haja maiores efeitos modulatórios tanto do ponto de vista inflamatório quanto da microbiota intestinal.

11 ORÇAMENTO

MATERIAL	QTD.	UNI.	PREÇO UNITÁRIO	PREÇO TOTAL
Balança plataforma digital	1	Até 180kg	R\$ 400,00	R\$ 400,00
Tonner para impressora color	1	Uni	R\$ 80,00	R\$ 80,00
Cópia para formulários	2000	Folhas	R\$ 0,15	R\$ 150,00
Papel ofício – formato A4	2000 Fls.	6 Resmas	R\$ 16,00	R\$ 96,00
Caneta	10	Uni.	R\$ 06,00	R\$ 6,20
Lapiseira	2	Uni	R\$ 1,50	R\$ 3,50
CD	2	Uni	R\$ 1,00	R\$ 2,00
Pen Driver – 8GB	2	Uni	R\$ 20,00	R\$ 40,00
Kit Sequenciamento-Laboratório	72	Uni.	R\$ 450,00	R\$ 32.000,00
Cápsulas de probióticos 0,4g	392	Uni	R\$ 4,20	R\$ 1.646,40
Cápsulas carbonato de cálcio 0,5g	224	Uni	R\$ 2,49	R\$ 90,00
Combustível para coleta de dados	300	Litros	R\$ 4,60	R\$ 1.380,00
Passagens de avião para congressos	2	Uni	R\$ 1.200,00	R\$ 2.400,00
Sorologia para <i>H. pylori</i> KIT SERION ELISA classic Helicobacter pylori*	12	Unid	R\$ 39,90	R\$ 478,80
TOTAL GERAL				R\$ 38.772,90
MATERIAL PERMANENTE DO PESQUISADOR*				
Bioimpedanciômetro Unifrequencial (1 frequência) Biodynamics 450	1	Unidade	R\$ 21.000,00	R\$ 00,00
Estadiômetro SANNY®	1	Uni	R\$ 500,00	R\$ 00,00
Adipômetro LANGE®	1	Uni	R\$ 1.800,00	R\$ 00,00

12 FONTE DE FINANCIAMENTO

O projeto obteve apoio financeiro por meio do programa POSGRAD a partir do PPGIBA e do Instituto Sensumed de Ensino e Pesquisa-ISENP, bem como do Laboratório LABGEN2, da Fundação Hospitalar de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas – FHMOAM, e do Programa de Apoio à Iniciação Científica – PAIC, da FCECON, por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPEAM.

14 EQUIPE DO PROJETO

Nome, Titulação	Instituição	Formação Acadêmica	Função
Ábner Souza Paz, MSc.	SENSUMED /FCECON	Nutricionista Oncológico	Doutorando
Beatriz Fiuza Gondim da Silva	FCECON	Nutricionista	Colaborador
Allyson Guimarães da Costa, PhD	FHEMOAM	Enfermeiro, Imunologista	Colaborador
Claudio Lucas dos Santos Catão	FHEMOAM	Biomédico	Colaborador
Daniel Barros de Castro, PhD	FVS	Biólogo, Epidemiologista	Colaborador
Higino Felipe Figueiredo, MSc.	FCECON	Cirurgião Oncológico	Colaborador
Cecilia da Cunha Camilo	CDL	Farmacêutica	Colaborador
José Fernando M. Barcellos, PhD	UFAM	Biólogo	Orientador
Jhonnatan Silva de Souza, Esp.	FCECON	Biomédico	Colaborador
Nayara Souza Castro, MSc.	FCECON	Bióloga, Nutricionista e Geneticista	Colaborador
Thalita Mendes	ESTÁCIO	Nutricionista	Colaborador
Samara Santarém Martins, MSc.	UFAM	Nutricionista	Colaborador
Valquíria do Carmo A. Martins, PhD	FCECON	Farmacêutica, Imunologista	Coorientadora
William Hiromi Fuzita, Esp.	SENSUMED	Médico Oncologista	Colaborador

15 REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7ª Edição**. 7ª Edição. [S. l.]: Elsevier Brasil, 2012.
- ABBAS, Abul K. *et al.* Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. **Science Immunology**, [S. l.], v. 3, n. 25, p. eaat1482, 6 jul. 2018. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.aat1482>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- ABDULAMIR, Ahmed S.; HAFIDH, Rand R.; ABU BAKAR, Fatimah. The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 11, 20 jan. 2011.
- ALMONACID, Daniel E. *et al.* Correction: 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. e0212474, 12 fev. 2019.
- AL-TAHHAN, Magdy A.; ETEWA, Rasha L.; EL BEHERY, Manal M. Association between circulating interleukin-1 beta (IL-1 β) levels and IL-1 β C-511T polymorphism with cervical cancer risk in Egyptian women. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 353, n. 1–2, p. 159–165, jul. 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. About Stomach Cancer | Stomach Cancer Overview & Research. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/stomach-cancer/about.html>. Acesso em: 25 jan. 2024.
- AMIR, Amnon *et al.* Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. **mSystems**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 10.1128/msystems.00191-16, 7 mar. 2017. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/msystems.00191-16>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ANBAZHAGAN, Arivarasu N. *et al.* Pathophysiology of IBD associated diarrhea. **Tissue Barriers**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. e1463897, 2018.
- ANDERSON, Ana C.; JOLLER, Nicole; KUCHROO, Vijay K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. **Immunity**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 989–1004, 17 maio 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4942846/>. Acesso em: 7 jan. 2024.
- ANDREOLLO, Nelson Adami; LOPES, Luiz Roberto; COELHO NETO, João de Souza. Complicações pós-operatórias após gastrectomia total no câncer gástrico: análise de 300 doentes. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [S. l.], v. 24, p. 126–130, jun. 2011a. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/hSPRhNPFNqzMFTwPbJnySpF/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ANDREOLLO, Nelson Adami; LOPES, Luiz Roberto; COELHO NETO, João de Souza. Complicações pós-operatórias após gastrectomia total no câncer gástrico: análise de 300 doentes. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [S. l.], v. 24, p. 126–130, jun. 2011b. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/hSPRhNPFNqzMFTwPbJnySpF/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ANG, Tiing Leong; FOCK, Kwong Ming. Clinical epidemiology of gastric cancer. **Singapore Medical Journal**, [S. l.], v. 55, n. 12, p. 621–628, dez. 2014.
- ANGELAKIS, Emmanouil *et al.* Glycans affect DNA extraction and induce substantial differences in gut metagenomic studies. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 26276, 18 maio 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep26276>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ANSARI, Shamshul; YAMAOKA, Yoshio. *Helicobacter pylori* Virulence Factor

- Cytotoxin-Associated Gene A (CagA)-Mediated Gastric Pathogenicity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 19, p. 7430, 8 out. 2020.
- ANTONIO CLÁUDIO GOULART DUARTE. **Avaliação nutricional: aspectos clínicos e laboratoriais**. São Paulo: [s. n.], 2007.
- AOKI, Teruaki *et al.* Irregular bowel movement in gastrectomized subjects: bowel habits, stool characteristics, fecal flora, and metabolites. **Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 396–404, out. 2012.
- APTE, Ron N.; VORONOV, Elena. Is interleukin-1 a good or bad “guy” in tumor immunobiology and immunotherapy? **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 222, p. 222–241, abr. 2008.
- ARGILÉS, Josep M.; BUSQUETS, Sílvia; LÓPEZ-SORIANO, Francisco J. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 668 Suppl 1, p. S81-86, set. 2011.
- ARGILÉS, Josep M.; BUSQUETS, Sílvia; LÓPEZ-SORIANO, Francisco J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 401–406, jul. 2003.
- ARGILÉS, Josep M. *et al.* The role of cytokines in cancer cachexia. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 263–268, dez. 2009.
- ARUMUGAM, Sudha; LAU, Christine SM; CHAMBERLAIN, Ronald S. Use of preoperative gabapentin significantly reduces postoperative opioid consumption: a meta-analysis. **Journal of Pain Research**, [S. l.], v. 9, p. 631–640, 12 set. 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/JPR.S112626>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ASSUMPÇÃO, Paulo Pimentel *et al.* The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma. **BMC gastroenterology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 223, 13 jul. 2020.
- AYYANNA, Repally; ANKAIAH, Dasari; ARUL, Venkatesan. Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of Probiotic Bacterium *Lactobacillus mucosae* AN1 and *Lactobacillus fermentum* SNR1 in Wistar Albino Rats. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.03063>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- BAJAJ, Jasmohan S. *et al.* Systems biology analysis of omeprazole therapy in cirrhosis demonstrates significant shifts in gut microbiota composition and function. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S. l.], v. 307, n. 10, p. G951-957, 15 nov. 2014.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 357, n. 9255, p. 539–545, 17 fev. 2001.
- BALKWILL, Frances. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 409–416, set. 2006.
- BARANDOUZI, Zahra Amirkhazadeh *et al.* Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: A Systematic Review. **Frontiers in Psychiatry**, [S. l.], v. 11, p. 541, 2020a.
- BARANDOUZI, Zahra Amirkhazadeh *et al.* Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: A Systematic Review. **Frontiers in Psychiatry**, [S. l.], v. 11, p. 541, 2020b.
- BARBOSA-SILVA, Maria Cristina G. *et al.* Can bioelectrical impedance analysis identify malnutrition in preoperative nutrition assessment? **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 422–426, maio 2003.
- BATISTA, M. L. *et al.* Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 9–16, jan. 2012.
- BAYS, Harold E. *et al.* Lipids and bariatric procedures part 1 of 2: Scientific

- statement from the National Lipid Association, American Society for Metabolic and Bariatric Surgery, and Obesity Medicine Association: EXECUTIVE SUMMARY. **Journal of Clinical Lipidology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 15–32, 2016.
- BEDNARZ-MISA, Iwona *et al.* Interleukins 4 and 13 and Their Receptors Are Differently Expressed in Gastrointestinal Tract Cancers, Depending on the Anatomical Site and Disease Advancement, and Improve Colon Cancer Cell Viability and Motility. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1463, jun. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1463>. Acesso em: 18 fev. 2024.
- BELZER, Clara *et al.* Microbial Metabolic Networks at the Mucus Layer Lead to Diet-Independent Butyrate and Vitamin B12 Production by Intestinal Symbionts. **mBio**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. e00770-17, 19 set. 2017.
- BESAGIO, Brenda Passos *et al.* Câncer gástrico: Revisão de literatura / Gastric Cancer: A Literature Review. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 16439–16450, 5 ago. 2021.
- BIK, Elisabeth M. *et al.* Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 103, n. 3, p. 732–737, 17 jan. 2006.
- BIKEL, Shirley *et al.* Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 13, p. 390–401, 1 jan. 2015.
- BING, Chen; TRAYHURN, Paul. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 201–207, maio 2008.
- BLACKBURN, G L; THORNTON, P A. Nutritional assessment of the hospitalized patient. **The Medical clinics of North America**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 11103–11115, 1 set. 1979.
- BLUM, David *et al.* Cancer cachexia: a systematic literature review of items and domains associated with involuntary weight loss in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 114–144, out. 2011.
- BORGES-CANHA, Marta *et al.* Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. **Revista Espanola De Enfermedades Digestivas**, [S. l.], v. 107, n. 11, p. 659–671, nov. 2015.
- BORSIG, L. *et al.* Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. **Oncogene**, [S. l.], v. 33, n. 25, p. 3217–3224, 19 jun. 2014.
- BOUTARD, Magali *et al.* Functional Diversity of Carbohydrate-Active Enzymes Enabling a Bacterium to Ferment Plant Biomass. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 10, n. 11, nov. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4230839/>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- BRAGHETTO, Italo *et al.* LIÇÕES APRENDIDAS ANALISANDO COMPLICAÇÕES DA GASTRECTOMIA TOTAL LAPAROSCÓPICA PARA CÂNCER GÁSTRICO. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [S. l.], v. 33, p. e1539, 18 dez. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/rbFBBRK9DdRbmTX6BLYXhxz/?lang=pt>. Acesso em: 7 mar. 2024.
- BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BROWN, Melissa A.; HURAL, John. Functions of IL-4 and Control of Its Expression. **Critical Reviews in Immunology**, [S. l.], v. 37, n. 2–6, p. 181–212, 2017.
- BRUNO, Giovanni *et al.* Proton pump inhibitors and dysbiosis: Current knowledge and aspects to be clarified. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 25, n. 22,

p. 2706–2719, 14 jun. 2019.

BUI, Jack D. *et al.* IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [S. l.], v. 176, n. 2, p. 905–913, 15 jan. 2006.

BULTMAN, Scott J.; JOBIN, Christian. Microbial-derived butyrate: an oncometabolite or tumor-suppressive metabolite? **Cell Host & Microbe**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 143–145, 13 ago. 2014.

BUTTERS, M. *et al.* Studies on nutritional status in general surgery patients by clinical, anthropometric, and laboratory parameters. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 405–410, jun. 1996.

CABRERO-DE LAS HERAS, Sara; MARTÍNEZ-BALIBREA, Eva. CXC family of chemokines as prognostic or predictive biomarkers and possible drug targets in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 24, n. 42, p. 4738–4749, 14 nov. 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6235799/>. Acesso em: 22 fev. 2024.

CAMPELO, Jefferson Clerke Lopes; LIMA, Lucas Chaves. Perfil

Clinicoepidemiológico do Câncer Gástrico Precoce em um Hospital de Referência em Teresina, Piauí. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 15–20, 30 mar. 2012.

CAO, Jiamin *et al.* A cause-effect relationship between Graves' disease and the gut microbiome contributes to the thyroid-gut axis: A bidirectional two-sample Mendelian randomization study. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 14, p. 977587, 2023.

CARCAS, Lauren Peirce. Gastric cancer review. **Journal of Carcinogenesis**, [S. l.], v. 13, p. 14, 2014.

CARTER, A. *et al.* The role of interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in human multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 424–431, abr. 1990.

CARVALHO, Vieira De. A CASE OF TOTAL GASTRECTOMY. **The Lancet**, [S. l.], v. 156, n. 4020, p. 798–799, 15 set. 1900. Disponível em:

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(01\)89234-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(01)89234-5/fulltext).

Acesso em: 26 jan. 2024.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [S. l.], v. 48, n. 10, p. 445–453, 1994.

CESSOT, Anatole *et al.* Defining the clinical condition of cancer patients: it is time to switch from performance status to nutritional status. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 869–870, jul. 2011.

CHAIA, A. Perez; OLIVER, G. Intestinal Microflora and Metabolic Activity. **Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health**. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2003. p. 77–98.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470774595.ch4>. Acesso em: 15 fev. 2024.

CHANG, Chun-Jung *et al.* Combined GM-CSF and IL-12 gene therapy synergistically suppresses the growth of orthotopic liver tumors. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 746–754, mar. 2007.

CHANG, Shih-Chang *et al.* A gut butyrate-producing bacterium *Butyricoccus pullicaecorum* regulates short-chain fatty acid transporter and receptor to reduce the progression of 1,2-dimethylhydrazine-associated colorectal cancer. **Oncology Letters**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1–1, 1 dez. 2020. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.12190>. Acesso em: 28 fev. 2024.

CHANG, Wen-Jun *et al.* Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, [S. l.], v. 20, n. 16, p. 4586–

4596, 28 abr. 2014. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4000495/>. Acesso em: 22 fev. 2024.

CHEN, Miao-Fen *et al.* Role of interleukin 1 beta in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 89–100, jan. 2012.

CHEN, Xiao-Hui *et al.* Mucosa-Associated Microbiota in Gastric Cancer Tissues Compared With Non-cancer Tissues. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 1261, 2019.

CHEN, Zhitao *et al.* Association between gut microbiota and hepatocellular carcinoma from 2011 to 2022: Bibliometric analysis and global trends. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 13, p. 1120515, 2023.

CLAVIEN, Pierre A. *et al.* The Clavien-Dindo Classification of Surgical Complications: Five-Year Experience. **Annals of Surgery**, [S. l.], v. 250, n. 2, p. 187, ago. 2009.

Disponível em:

https://journals.lww.com/annalsofsurgery/abstract/2009/08000/the_clavien_dindo_classification_of_surgical.2.aspx. Acesso em: 15 fev. 2024.

CLINTON, Steven K.; GIOVANNUCCI, Edward L.; HURSTING, Stephen D. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. **The Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 150, n. 4, p. 663, abr. 2020.

COLE, T. J.; FREEMAN, J. V.; PREECE, M. A. Body mass index reference curves for the UK, 1990. **Archives of Disease in Childhood**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 25–29, jul. 1995.

COSTELLO, Elizabeth K. *et al.* Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 18 dez. 2009. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3602444/>. Acesso em: 31 jan. 2024.

COX-REIJVEN, Petronella L. M.; VAN KREEL, Bernard; SOETERS, Peter B. Bioelectrical impedance measurements in patients with gastrointestinal disease: validation of the spectrum approach and a comparison of different methods for screening for nutritional depletion. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 78, n. 6, p. 1111–1119, dez. 2003.

CRAWFORD, R. M. *et al.* B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [S. l.], v. 139, n. 1, p. 135–141, 1 jul. 1987.

CUI, Guanghui *et al.* Gut microbiome and frailty: insight from genetic correlation and mendelian randomization. **Gut Microbes**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 2282795, 18 dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2282795>. Acesso em: 1 mar. 2024.

CUI, Ming *et al.* Evaluation of immune responses of gastric cancer patients treated by laparoscopic and open gastrectomy. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 253, nov. 2015.

DE VITA, Ferdinando *et al.* Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. **Cancer**, [S. l.], v. 86, n. 10, p. 1936–1943, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0142%2819991115%2986%3A10%3C1936%3A%3AAID-CNCR9%3E3.0.CO%3B2-9>. Acesso em: 29 jan. 2024.

DHAKAN, D. B. *et al.* The unique composition of Indian gut microbiome, gene catalogue, and associated fecal metabolome deciphered using multi-omics approaches. **GigaScience**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. giz004, 1 mar. 2019.

DICKSVED, Johan *et al.* Molecular characterization of the stomach microbiota in

- patients with gastric cancer and in controls. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. Pt 4, p. 509–516, abr. 2009.
- DINDO, Daniel. The Clavien–Dindo Classification of Surgical Complications. *In*: CUESTA, M. A.; BONJER, H. J. (org.). **Treatment of Postoperative Complications After Digestive Surgery**. London: Springer, 2014. p. 13–17. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4354-3_3. Acesso em: 15 fev. 2024.
- DOORAKKERS, Eva *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Cohort Studies. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 108, n. 9, p. djw132, set. 2016.
- DOUMATEY, Ayo P. *et al.* Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 63, 2020.
- DUNCAN, Sylvia H.; LOUIS, Petra; FLINT, Harry J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 10, p. 5810–5817, out. 2004.
- EECKHAUT, Venessa *et al.* *Butyricoccus pullicaecorum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 2799–2802, 2008. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijso.0.65730-0>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- EID, Hoda M. *et al.* Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medicinal Plant and Food Ingredients. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, p. 387, 30 jun. 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00387/full>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- EL-OMAR, E. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. **Gut**, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 743–747, jun. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1728311/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- ENGLAND, Hazel *et al.* Release of Interleukin-1 α or Interleukin-1 β Depends on Mechanism of Cell Death. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 289, n. 23, p. 15942–15950, 6 jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047367/>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- ERAWIJANTARI, Pande Putu *et al.* Influence of gastrectomy for gastric cancer treatment on faecal microbiome and metabolome profiles. **Gut**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 1404–1415, ago. 2020.
- FAN, Peixin *et al.* Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 43412, 2 mar. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep43412>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- FCECON, Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas. Relatório de Gestão Anual - 2022. [S. l.], 2022. Disponível em: <http://www.fcecon.am.gov.br/wp-content/uploads/2023/05/Relatorio-de-Gestao-2022.pdf>.
- FCECON, Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas. **Relatório de Gestão Anual - 2022**. Gestão Anual 2022. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <http://www.fcecon.am.gov.br/wp-content/uploads/2023/05/Relatorio-de-Gestao-2022.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- FEI, Na; ZHAO, Liping. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. **The ISME journal**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 880–884, abr. 2013.
- FENG, Qiang *et al.* Gut microbiome development along the colorectal adenoma-

- carcinoma sequence. **Nature Communications**, [S. l.], v. 6, p. 6528, 11 mar. 2015.
- FENG, Yijie *et al.* The Alterations of Gut Microbiome and Lipid Metabolism in Patients with Spinal Muscular Atrophy. **Neurology and Therapy**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 961–976, jun. 2023.
- FERRONE, Cristina; DRANOFF, Glenn. Dual Roles for Immunity in Gastrointestinal Cancers. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 28, n. 26, p. 4045–4051, 10 set. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872327/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- FIGUEIREDO, Alexandre R. T.; KRAMER, Jos. Cooperation and Conflict Within the Microbiota and Their Effects On Animal Hosts. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [S. l.], v. 8, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2020.00132>. Acesso em: 25 fev. 2024.
- FINN, Olivera J. Cancer immunology. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 358, n. 25, p. 2704–2715, 19 jun. 2008.
- FLOOD, Anna *et al.* The use of hand grip strength as a predictor of nutrition status in hospital patients. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 106–114, fev. 2014.
- FONTANIVE, R., DE PAULA, T. P., PERES, W. A., & DUARTE, A. C. **Avaliação nutricional: aspectos clínicos e laboratoriais**. [S. l.: s. n.], 2007.
- FRAGAS, Roberta Flores Marquezini. Prevalência da desnutrição em hospitais públicos de grande porte em Manaus - AM. Accepted: 2015-08-07T14:00:45Z, 16 jul. 2015. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/4549>. Acesso em: 30 jan. 2024.
- FRANCESONE, Ralph; HOU, Vivianty; GRIVENNIKOV, Sergei I. Microbiome, Inflammation and Cancer. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 181–189, 2014a.
- FRANCESONE, Ralph; HOU, Vivianty; GRIVENNIKOV, Sergei I. Microbiome, Inflammation and Cancer. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 181–189, 2014b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112188/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- FRANKEL, Arthur E. *et al.* Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. **Neoplasia**, [S. l.], p. 848–855, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5602478>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- FREEMAN, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 192, n. 7, p. 1027–1034, 2 out. 2000.
- FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 34, n. 11, p. 2540–2545, 1 nov. 1981. Disponível em: [https://ajcn.nutrition.org/article/S0002-9165\(23\)43220-0/abstract](https://ajcn.nutrition.org/article/S0002-9165(23)43220-0/abstract). Acesso em: 15 fev. 2024.
- FUJITANI, Kazumasa *et al.* Gastrectomy plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric cancer with a single non-curable factor (REGATTA): a phase 3, randomised controlled trial. **The Lancet. Oncology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 309–318, mar. 2016.
- FUKUDA, Yasunari *et al.* Sarcopenia is associated with severe postoperative complications in elderly gastric cancer patients undergoing gastrectomy. **Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 986–993, jul. 2016.
- FUNG, Thomas C.; OLSON, Christine A.; HSIAO, Elaine Y. Interactions between the

- microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 145–155, fev. 2017.
- GAINES, S. *et al.* Gut microbiome influences on anastomotic leak and recurrence rates following colorectal cancer surgery. **The British Journal of Surgery**, [S. l.], v. 105, n. 2, p. e131–e141, jan. 2018.
- GALMICHE, Antoine; RASSOW, Joachim. Targeting of Helicobacter pylori VacA to mitochondria. **Gut Microbes**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 392–395, 2010.
- GILBERT, Jack *et al.* Current understanding of the human microbiome. **Nature medicine**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 392–400, 10 abr. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7043356/>. Acesso em: 24 fev. 2024.
- GONG, Zhenqiang *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist inhibits angiogenesis in gastric cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 659–670, ago. 2018.
- GOPALAKRISHNAN, Vancheswaran *et al.* The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 570–580, 9 abr. 2018.
- GRUNDMANN, O.; YOON, S. L.; WILLIAMS, J. J. The value of bioelectrical impedance analysis and phase angle in the evaluation of malnutrition and quality of life in cancer patients--a comprehensive review. **European Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 69, n. 12, p. 1290–1297, dez. 2015.
- GRYAZNOVA, M. V. *et al.* Study of microbiome changes in patients with ulcerative colitis in the Central European part of Russia. **Heliyon**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. e06432, mar. 2021.
- GUERRERO-PRESTON, Rafael *et al.* 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 32, p. 51320–51334, 9 ago. 2016.
- GULEN, Sule T. *et al.* Adipokines and systemic inflammation in weight-losing lung cancer patients. **Lung**, [S. l.], v. 190, n. 3, p. 327–332, jun. 2012.
- GUPTA, Digant *et al.* The relationship between bioelectrical impedance phase angle and subjective global assessment in advanced colorectal cancer. **Nutrition Journal**, [S. l.], v. 7, p. 19, 30 jun. 2008.
- GUYTON, Kristina; ALVERDY, John C. The gut microbiota and gastrointestinal surgery. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 43–54, jan. 2017.
- HALPERN-SILVEIRA, Denise *et al.* Body weight and fat-free mass changes in a cohort of patients receiving chemotherapy. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 617–625, maio 2010.
- HART, Lara *et al.* Faecal Calprotectin Predicts Endoscopic and Histological Activity in Clinically Quiescent Ulcerative Colitis. **Journal of Crohn's & Colitis**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 46–52, 1 jan. 2020.
- HATAYE, Jason M.; PALMORE, Tara N.; POWERS, John H. Duodenal infusion of feces for recurrent Clostridium difficile. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 368, n. 22, p. 2143–2144, 30 maio 2013.
- HEIMAN, Mark L.; GREENWAY, Frank L. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. **Molecular Metabolism**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 317–320, 5 mar. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837298/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- HEINKEN, Almut *et al.* Systematic assessment of secondary bile acid metabolism in gut microbes reveals distinct metabolic capabilities in inflammatory bowel disease. **Microbiome**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 75, 15 maio 2019.
- HESSLS, Jan *et al.* Evaluation of Prevent ID and Quantum Blue rapid tests for fecal

- calprotectin. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1079–1082, 13 jan. 2012.
- HEUFLER, C. *et al.* Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 659–668, mar. 1996.
- HOLD, Georgina L. *et al.* A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 132, n. 3, p. 905–912, mar. 2007.
- HOLLAND, G.; ZLOTNIK, A. Interleukin-10 and cancer. **Cancer Investigation**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 751–758, 1993.
- HOLLANDER, Daniel; KAUNITZ, Jonathan D. The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? **Digestive Diseases and Sciences**, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 1277–1287, maio 2020.
- HORVATH, Angela *et al.* Distal Gastrectomy with Billroth II Reconstruction is Associated with Oralization of Gut Microbiome and Intestinal Inflammation: A Proof-of-Concept Study. **Annals of Surgical Oncology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 1198–1208, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7801296/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- HOUGHTON, Alan N.; GUEVARA-PATIÑO, José A. Immune recognition of self in immunity against cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 114, n. 4, p. 468–471, ago. 2004.
- HOVE, H.; NORDGAARD-ANDERSEN, I.; MORTENSEN, P. B. Faecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 255–259, mar. 1994.
- HOWARD, M. *et al.* Biological properties of interleukin 10. **Journal of Clinical Immunology**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 239–247, jul. 1992.
- HUA, Hanju *et al.* Intestinal Microbiota in Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. **Frontiers in Medicine**, [S. l.], v. 9, p. 888340, 20 jul. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9348271/>. Acesso em: 27 fev. 2024.
- HUANG, Kun *et al.* Salivary Microbiota for Gastric Cancer Prediction: An Exploratory Study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 640309, 2021.
- IKEGUCHI, Masahide *et al.* Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer. **Gastric Cancer**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 95–100, 1 jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10120-009-0509-8>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- IMHANN, Floris *et al.* Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. **Gut**, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 740–748, maio 2016.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional De Câncer, 2023.
- ISLAM, Md Zohorul *et al.* Reproducible and opposing gut microbiome signatures distinguish autoimmune diseases and cancers: a systematic review and meta-analysis. **Microbiome**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 218, 9 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01373-1>. Acesso em: 25 fev. 2024.
- JACKSON, Matthew A. *et al.* Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. **Gut**, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 749–756, maio 2016.
- JÄHNE, J.; PISO, P.; MEYER, H. J. 1114 total gastrectomies in the surgical treatment of primary gastric adenocarcinoma--a 30-year single institution experience. **Hepato-Gastroenterology**, [S. l.], v. 48, n. 41, p. 1222–1226, 2001.
- JAKOBSSON, Hedvig E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. **Gut**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 559–566, abr. 2014.
- JEPPSSON, Bengt; MANGELL, Peter; THORLACIUS, Henrik. Use of Probiotics as

- Prophylaxis for Postoperative Infections. **Nutrients**, [S. I.], v. 3, n. 5, p. 604–612, maio 2011. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/3/5/604>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- JUMAS-BILAK, Estelle *et al.* Acidaminococcus intestini sp. nov., isolated from human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. I.], v. 57, n. 10, p. 2314–2319, 2007. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.64883-0>. Acesso em: 27 fev. 2024.
- KANG, Seungha *et al.* Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. I.], v. 16, n. 12, p. 2034–2042, dez. 2010.
- KARANICOLAS, Paul J. *et al.* Quality of life after gastrectomy for adenocarcinoma: a prospective cohort study. **Annals of Surgery**, [S. I.], v. 257, n. 6, p. 1039–1046, jun. 2013.
- KASHYAP, Sheetal *et al.* Understanding the cross-talk between human microbiota and gastrointestinal cancer for developing potential diagnostic and prognostic biomarkers. **Seminars in Cancer Biology**, [S. I.], v. 86, n. Pt 3, p. 643–651, nov. 2022.
- KATAYAMA, Hiroshi *et al.* Extended Clavien-Dindo classification of surgical complications: Japan Clinical Oncology Group postoperative complications criteria. **Surgery Today**, [S. I.], v. 46, n. 6, p. 668–685, jun. 2016.
- KHAROFA, Jordan *et al.* Metagenomic analysis of the fecal microbiome in colorectal cancer patients compared to healthy controls as a function of age. **Cancer Med**, [S. I.], , p. 2945–2957, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9939174>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- KHATOON, Jahanarah; RAI, Ravi Prakash; PRASAD, Kashi Nath. Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: Updates. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, [S. I.], v. 8, n. 2, p. 147–158, 15 fev. 2016.
- KI, Mi-Ran *et al.* Differential regulation of ERK1/2 and p38 MAP kinases in VacA-induced apoptosis of gastric epithelial cells. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S. I.], v. 294, n. 3, p. G635–647, mar. 2008.
- KIM, Ae Ran *et al.* Changes of quality of life in gastric cancer patients after curative resection: a longitudinal cohort study in Korea. **Annals of Surgery**, [S. I.], v. 256, n. 6, p. 1008–1013, dez. 2012.
- KIM, Do-Kyong *et al.* Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. **BMC cancer**, [S. I.], v. 9, p. 155, 20 maio 2009.
- KNIGHT, Rob *et al.* Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews. Microbiology**, [S. I.], v. 16, n. 7, p. 410–422, jul. 2018.
- KOGA, Yasuhiro. Microbiota in the stomach and application of probiotics to gastroduodenal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, [S. I.], v. 28, n. 47, p. 6702–6715, 21 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9813937/>. Acesso em: 16 fev. 2024.
- KONG, Fanli; CAI, Yi. Study Insights into Gastrointestinal Cancer through the Gut Microbiota. **BioMed Research International**, [S. I.], v. 2019, p. e8721503, 24 jun. 2019. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/8721503/>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- KRISTENSEN, Nadja B. *et al.* Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. **Genome Medicine**, [S. I.], v. 8, n. 1, p. 52, 10 maio 2016.
- KUPER, H.; ADAMI, H. O.; TRICHOPOULOS, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **Journal of Internal Medicine**, [S. I.], v. 248, n. 3, p. 171–

183, set. 2000.

LAHEY, F. H. Total gastrectomy. **The Surgical Clinics of North America**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 747–765, jun. 1949.

LANDE, Russell. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. **Oikos**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 5, maio 1996. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3545743?origin=crossref>. Acesso em: 23 fev. 2024.

LEE, Ji Ae *et al.* Differential immune microenvironmental features of microsatellite-unstable colorectal cancers according to *Fusobacterium nucleatum* status. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 47–59, jan. 2021.

LEE, Joo-Young *et al.* Oral seeding and niche-adaptation of middle ear biofilms in health. **Biofilm**, [S. l.], v. 3, p. 100041, dez. 2021.

LEE, Y S *et al.* Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 106, n. 11, p. 1833–1841, 22 maio 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3364111/>. Acesso em: 22 fev. 2024.

LENSCHOW, D. J. *et al.* Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [S. l.], v. 153, n. 5, p. 1990–1997, 1 set. 1994.

LEVY, Maayan *et al.* Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 219–232, abr. 2017.

LI, Jun *et al.* Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 113, n. 9, p. E1306–E1315, mar. 2016. Disponível em:

<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1518189113>. Acesso em: 31 jan. 2024.

LI, Xiaoqin *et al.* Effect of synbiotic supplementation on immune parameters and gut microbiota in healthy adults: a double-blind randomized controlled trial. **Gut Microbes**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 2247025, 2023. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10453972/>. Acesso em: 29 fev. 2024.

LIANG, Weiren *et al.* Gut microbiota shifts in patients with gastric cancer in perioperative period. **Medicine**, [S. l.], v. 98, n. 35, p. e16626, ago. 2019.

LIN, Xi-Hsuan *et al.* The long term effect of metabolic profile and microbiota status in early gastric cancer patients after subtotal gastrectomy. **PloS One**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. e0206930, 2018a.

LIN, Xi-Hsuan *et al.* The long term effect of metabolic profile and microbiota status in early gastric cancer patients after subtotal gastrectomy. **PloS One**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. e0206930, 2018b.

LIU, Biao *et al.* Liver sinusoidal endothelial cell lectin inhibits CTL-dependent virus clearance in mouse models of viral hepatitis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [S. l.], v. 190, n. 8, p. 4185–4195, 15 abr. 2013.

LIU, Xinpeng *et al.* Association of gut microbiome and oral cavity cancer: A two sample mendelian randomization and case-control study. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 101736, 1 set. 2024.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468785523003579>. Acesso em: 1 mar. 2024.

LIU, Yuting *et al.* Alloprevotella Can be Considered as a Potential Oral Biomarker in Intestinal Metaphase of Gastric Patients. **Studies in Health Technology and Informatics**, [S. l.], v. 308, p. 155–167, 23 nov. 2023.

LIU, Zhen *et al.* Distal gastrectomy versus total gastrectomy for distal gastric cancer. **Medicine**, [S. l.], v. 96, n. 5, p. e6003, fev. 2017.

LOPETUSO, Loris R *et al.* Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. **Gut Pathogens**, [S. l.], v. 5, p. 23, 13 ago. 2013. Disponível em:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3751348/>. Acesso em: 3 mar. 2024. LOPETUSO, Loris R.; CHOWDHRY, Saleem; PIZARRO, Theresa T. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 4, p. 181, 2013.
- LOUIS, Petra; HOLD, Georgina L.; FLINT, Harry J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews. Microbiology**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 661–672, out. 2014.
- LOZUPONE, Catherine A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, [S. l.], v. 489, n. 7415, p. 220–230, 13 set. 2012.
- LOZUPONE, Catherine A. *et al.* Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 5, p. 1576–1585, mar. 2007.
- LUO, Quan; HIESSL, Sebastian; STEINBÜCHEL, Alexander. Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 29–48, jan. 2014.
- MA, Lingyan *et al.* *Clostridium butyricum* and Its Derived Extracellular Vesicles Modulate Gut Homeostasis and Ameliorate Acute Experimental Colitis. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e01368-22, 28 jun. 2022. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/spectrum.01368-22>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- MA, Lingyan *et al.* Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice. **Gut Microbes**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1832857, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7668533/>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- MACHLOWSKA, Julita *et al.* Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 4012, 4 jun. 2020.
- MAEKITA, Takao *et al.* High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 3 Pt 1, p. 989–995, 1 fev. 2006.
- MALFERTHEINER, Peter; KANDULSKI, Arne; VENERITO, Marino. Proton-pump inhibitors: understanding the complications and risks. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 697–710, dez. 2017.
- MARTINSEN, Tom C.; BERGH, Kåre; WALDUM, Helge L. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 94–102, fev. 2005.
- MCCORMACK, Ursula M. *et al.* Exploring a Possible Link between the Intestinal Microbiota and Feed Efficiency in Pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 83, n. 15, p. e00380-17, 17 jul. 2017. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00380-17>. Acesso em: 1 mar. 2024.
- MCGEACHY, Mandy J; CUA, Daniel J; GAFFEN, Sarah L. The IL-17 family of cytokines in health and disease. **Immunity**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 892–906, 16 abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6474359/>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- MCINTYRE, K. W. *et al.* Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 173, n. 4, p. 931–939, 1 abr. 1991.
- MELO BARBOSA, Hivana Patricia *et al.* Interleukin-1 and TNF- α polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 1465–1471, 28 mar. 2009.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2665140/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

MENDES, Andrea dos Santos; SANTANA, Mary Elizabeth de. Conhecimento de cuidadores sobre prevenção do câncer gástrico. **Rev. Pesqui. (Univ. Fed. Estado Rio J., Online)**, [S. l.], p. 1194–1201, 2019. Disponível em:

http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/7188/pdf_1.

Acesso em: 26 jan. 2024.

MIAO, Yingying *et al.* Gut Microbiota Dysbiosis in the Development and Progression of Gastric Cancer. **Journal of Oncology**, [S. l.], v. 2022, p. e9971619, 28 ago. 2022.

Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jo/2022/9971619/>. Acesso em: 28 fev. 2024.

MILLER, Michelle C.; MAYO, Kevin H. Chemokines from a Structural Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 2088, 2 out. 2017.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666770/>.

Acesso em: 22 fev. 2024.

MINIHANE, Anne M. *et al.* Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. **The British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 114, n. 7, p. 999–1012, 14 out. 2015.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4579563/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

MITROPOULOS, Dionysios *et al.* Validation of the Clavien–Dindo Grading System in Urology by the European Association of Urology Guidelines Ad Hoc Panel.

European Urology Focus, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 608–613, 1 jul. 2018.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405456917300627>. Acesso em: 15 fev. 2024.

MIZRAHI, Ido *et al.* Colon Cancer Associated Transcript-1 (CCAT1) Expression in Adenocarcinoma of the Stomach. **Journal of Cancer**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 105–110, 1 jan. 2015.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280392/>.

Acesso em: 29 jan. 2024.

MORGAN, Xochitl C. *et al.* Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome Biology**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. R79, 16 abr. 2012.

2012.

MORVAN, Maelig G.; LANIER, Lewis L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. **Nature Reviews. Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 7–19, jan. 2016.

MOYAT, Mati; VELIN, Dominique. Immune responses to Helicobacter pylori infection.

World Journal of Gastroenterology, [S. l.], v. 20, n. 19, p. 5583–5593, 21 maio 2014.

MUELLER, Tara C. *et al.* Parenteral nutrition during neoadjuvant chemotherapy for patients with non-metastatic gastric or esophago-gastric cancer to reduce postoperative morbidity (PERCOG): study protocol for a randomized controlled trial.

Trials, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 621, 28 dez. 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13063-017-2388-3>. Acesso em: 29 jan. 2024.

MURARO, Cirilo Luiz Pardo Mêo. Câncer gástrico precoce: contribuição ao diagnóstico e resultado do tratamento cirúrgico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [S. l.], v. 30, p. 352–358, out. 2003.

NABIOULLIN, R. *et al.* Interleukin-10 is a potent inhibitor of tumor cytotoxicity by human monocytes and alveolar macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 437–442, abr. 1994.

NAKAZAKI, H. Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 709–713, 1 ago. 1992a.

NAKAZAKI, H. Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 709–713, 1 ago. 1992b.

NARDONE, Gerardo; COMPARE, Debora. The human gastric microbiota: Is it time

- to rethink the pathogenesis of stomach diseases? **United European Gastroenterology Journal**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 255–260, jun. 2015.
- NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 319–326, fev. 1987.
- NGUYEN, Khue G. *et al.* Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, p. 575597, 15 out. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7593768/>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- NIKITINA, Darja *et al.* Comparison of genomic and transcriptional microbiome analysis in gastric cancer patients and healthy individuals. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1202–1218, 21 fev. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10011954/>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- NOUGAYRÈDE, Jean-Philippe *et al.* Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 313, n. 5788, p. 848–851, 11 ago. 2006.
- NOVA, Esther *et al.* The Role of Probiotics on the Microbiota: Effect on Obesity. **Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 387–400, jun. 2016.
- OHIGASHI, Seiji *et al.* Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer. **Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 1657–1664, set. 2013.
- O'KEEFE, Stephen J D. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, [S. l.], v. 13, n. 12, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27848961/>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- OPPERMAN, Christoffel J. Etymologia: Nocardia. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 2789, nov. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7588554/>. Acesso em: 25 fev. 2024.
- O'RIORDAIN, M. G. *et al.* Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 823–827, out. 1999.
- OUYANG, Wenjun *et al.* Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 29, p. 71–109, 2011.
- PALM, Noah W.; DE ZOETE, Marcel R.; FLAVELL, Richard A. Immune-microbiota interactions in health and disease. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, [S. l.], v. 159, n. 2, p. 122–127, ago. 2015.
- PAPPAS-GOGOS, George *et al.* The Implication of Gastric Microbiome in the Treatment of Gastric Cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 2039, jan. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/8/2039>. Acesso em: 5 mar. 2024.
- PARAMSOTHY, Sudarshan *et al.* Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 389, n. 10075, p. 1218–1228, 25 mar. 2017.
- PAREEK, Chandra Shekhar; SMOCZYNSKI, Rafal; TRETYN, Andrzej. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 413–435, nov. 2011.
- PAREKH, Parth J; BALART, Luis A; JOHNSON, David A. The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. e91, jun. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816244/>. Acesso em: 26 jan.

2024.

PARK, Jae Yong *et al.* Dysbiotic change in gastric microbiome and its functional implication in gastric carcinogenesis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 4285, 11 mar. 2022.

PASCALE, Alessia *et al.* Microbiota and metabolic diseases. **Endocrine**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 357–371, set. 2018.

PATRONE, Vania *et al.* Postoperative Changes in Fecal Bacterial Communities and Fermentation Products in Obese Patients Undergoing Bilio-Intestinal Bypass. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, p. 200, 2016.

PAUL, Bidisha *et al.* Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. **Clinical Epigenetics**, [S. l.], v. 7, p. 112, 2015.

PAZ, Ábner Souza *et al.* Ângulo de fase como marcador prognóstico para o óbito e desnutrição em gastrectomias por câncer gástrico no Amazonas / Phase angle as a prognostic marker for death and malnutrition in gastrectomies by gastric cancer in Amazonas. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 7603–7613, 8 jul. 2020. Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/12801>. Acesso em: 30 jan. 2024.

PEDERSEN, Bente Klarlund; FEBBRAIO, Mark. Muscle-derived interleukin-6--a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 371–376, set. 2005.

PENG, Peter *et al.* Impact of sarcopenia on outcomes following resection of pancreatic adenocarcinoma. **Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 1478–1486, ago. 2012.

PÉREZ CAMARGO, Dana A. *et al.* Phase Angle of Bioelectrical Impedance Analysis as Prognostic Factor in Palliative Care Patients at the National Cancer Institute in Mexico. **Nutrition and Cancer**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 601–606, 2017.

PEREZ-PEREZ, Guillermo I. *et al.* Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1869–1873, ago. 2005.

PIRAS, Vincent; SELVARAJOO, Kumar. Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, p. 70, 24 fev. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932418/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

POUDEL, Shyam K. *et al.* Microbiomic profiles of bile in patients with benign and malignant pancreaticobiliary disease. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 39, n. 3_suppl, p. 417–417, 20 jan. 2021. Disponível em: https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2021.39.3_suppl.417. Acesso em: 1 mar. 2024.

POURALI, Ghazaleh *et al.* Microbiome as a biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 16, 5 jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03166-4>. Acesso em: 25 fev. 2024.

QUIGLEY, Eamonn M M. Editorial: Thought for food: diet and gut health. **Current opinion in gastroenterology**, [S. l.], v. 35, n. 2, mar. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30585792/>. Acesso em: 29 jan. 2024.

RAJILIC-STOJANOVIC, Mirjana *et al.* Systematic review: gastric microbiota in health and disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 51, n. 6, p. 582–

- 602, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apt.15650>. Acesso em: 5 mar. 2024.
- RAMAN, Dayanidhi *et al.* ROLE OF CHEMOKINES IN TUMOR GROWTH. **Cancer letters**, [S. l.], v. 256, n. 2, p. 137–165, 28 out. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2065851/>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- RAWLA, Prashanth; BARSOUK, Adam. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. **Przegląd Gastroenterologiczny**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 26–38, 2019.
- REINHARDT, Christoph *et al.* Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. **Nature**, [S. l.], v. 483, n. 7391, p. 627–631, 11 mar. 2012.
- RICABONI, D. *et al.* “*Negativibacillus massiliensis*” gen. nov., sp. nov., isolated from human left colon. **New Microbes and New Infections**, [S. l.], v. 17, p. 36–38, 15 nov. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328706/>. Acesso em: 29 fev. 2024.
- ROGERS, Matthew B. *et al.* Disturbances of the Perioperative Microbiome Across Multiple Body Sites in Patients Undergoing Pancreaticoduodenectomy. **Pancreas**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 260–267, fev. 2017a.
- ROGERS, Matthew B. *et al.* Disturbances of the Perioperative Microbiome Across Multiple Body Sites in Patients Undergoing Pancreaticoduodenectomy. **Pancreas**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 260–267, fev. 2017b.
- ROSENBERG, Steven A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 15 jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6293462/>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- RØSETH, A. G.; SCHMIDT, P. N.; FAGERHOL, M. K. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 50–54, jan. 1999.
- ROSHANI, Rozita; MCCARTHY, Fiona; HAGEMANN, Thorsten. Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 345, n. 2, p. 157–163, 10 abr. 2014.
- ROXBURGH, C. S. D.; MCMILLAN, D. C. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 110, n. 6, p. 1409–1412, 18 mar. 2014.
- RUSSO, Edda *et al.* The interplay between the microbiome and the adaptive immune response in cancer development. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 594–605, jul. 2016.
- RUZZO, A. *et al.* Interleukin 1B gene (*IL-1B*) and interleukin 1 receptor antagonist gene (*IL-1RN*) polymorphisms in *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 887–892, 1 jun. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419476461>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- RYDÉN, Mikael *et al.* Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. **Cancer**, [S. l.], v. 113, n. 7, p. 1695–1704, 1 out. 2008.
- SADAHIRO, Sotaro *et al.* Comparison between oral antibiotics and probiotics as bowel preparation for elective colon cancer surgery to prevent infection: Prospective randomized trial. **Surgery**, [S. l.], v. 155, n. 3, p. 493–503, 1 mar. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039606013002894>. Acesso em: 15 fev. 2024.

- SALAS, Sébastien *et al.* Nutritional factors as predictors of response to radio-chemotherapy and survival in unresectable squamous head and neck carcinoma. **Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 195–200, maio 2008.
- SÁNCHEZ-ZAUCO, Norma *et al.* Circulating blood levels of IL-6, IFN- γ , and IL-10 as potential diagnostic biomarkers in gastric cancer: a controlled study. **BMC cancer**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 384, 30 maio 2017.
- SARHADI, Virinder *et al.* Gut microbiota of patients with different subtypes of gastric cancer and gastrointestinal stromal tumors. **Gut Pathogens**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 11, 17 fev. 2021.
- SARHILL, N. *et al.* Evaluation of nutritional status in advanced metastatic cancer. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 652–659, out. 2003.
- SASSONE-CORSI, Martina; RAFFATELLU, Manuela. No Vacancy: How Beneficial Microbes Cooperate with Immunity To Provide Colonization Resistance to Pathogens. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 194, n. 9, p. 4081–4087, 1 maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- SCHOLTE, Ger H. A. *et al.* Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. **The American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 97, n. 7, p. 1687–1695, jul. 2002.
- SCHRADER, C. *et al.* PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 1 nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- SCHULZ, Christian *et al.* The role of the gastric bacterial microbiome in gastric cancer: *Helicobacter pylori* and beyond. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, [S. l.], v. 12, p. 1756284819894062, 18 dez. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6920592/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- SCHWABE, Robert F.; JOBIN, Christian. The microbiome and cancer. **Nature Reviews. Cancer**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 800–812, nov. 2013.
- SCHWARTSBURD, P. M. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. **Cancer Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 95–102, mar. 2003.
- SENCUKOVA, Marina A. *Helicobacter Pylori* and Gastric Cancer Progression. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 79, n. 12, p. 383, 3 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03089-9>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- SENGA, Daniella Miriê Yamaguti; LIU, Ângela Sun Li Wu; FRANGELLA, Vera Silvia. Probióticos no pré e pós-operatório de câncer colorretal. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, [S. l.], v. 11, n. 2, 25 jul. 2023. Disponível em: https://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/saude_desenvolvimento/article/view/9755. Acesso em: 7 mar. 2024.
- SETHI, Vrishketan *et al.* Gut Microbiota Promotes Tumor Growth in Mice by Modulating Immune Response. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 155, n. 1, p. 33-37.e6, jul. 2018.
- SHEN, Ying-Chun *et al.* An Exploratory Study for the Association of Gut Microbiome with Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor in Patients with Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Hepatocellular Carcinoma**, [S. l.], v. 8, p. 809–822, 2021.
- SHI, Jing; QU, Yi-Ping; HOU, Peng. Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, [S. l.], v. 20, n. 38, p. 13804–13819, 14 out. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4194564/>.

Acesso em: 29 jan. 2024.

SHIMAMURA, H. *et al.* Autologous serum deprivation restored IL-1 receptor antagonist production by peripheral blood mononuclear cells in patients with gastric cancer. **The Journal of International Medical Research**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 277–287, 2000.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 496–503, set. 2015a.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 496–503, set. 2015b.

SHIVAPPA, Nitin; STECK, Susan E.; *et al.* Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. **Public Health Nutrition**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 1689–1696, ago. 2014.

SHIVAPPA, Nitin; PRIZMENT, Anna E.; *et al.* Dietary inflammatory index and risk of colorectal cancer in the Iowa Women's Health Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 2383–2392, nov. 2014.

SHIVAPPA, Nitin; HÉBERT, James R.; RASHIDKHANI, Bahram. Dietary Inflammatory Index and risk of esophageal squamous cell cancer in a case-control study from Iran. **Nutrition and cancer**, [S. l.], v. 67, n. 8, p. 1253–1259, 2015.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821158/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

SILVA, Flávia Moraes. **Avaliação Nutricional do Adulto/Idoso Hospitalizado**. [S. l.]: Editora Appris, 2021. Disponível em:

<https://books.google.com.br/books?id=Pb86EAAAQBAJ>.

SILVA, Rafaella de Andrade *et al.* SERUM VITAMIN B12, IRON AND FOLIC ACID DEFICIENCIES IN OBESE INDIVIDUALS SUBMITTED TO DIFFERENT BARIATRIC TECHNIQUES. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD = Brazilian archives of digestive surgery**, [S. l.], v. 29Suppl 1, n. Suppl 1, p. 62–66, 2016.

SILVA, Ygor Parladore. Avaliação de protocolos de extração, purificação e PCR de DNA de fezes humanas para estudo de microbioma. [S. l.], 2018.

SINGH, Varun Pratap *et al.* Role of probiotics in health and disease: a review. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 253–257, fev. 2013.

SINGH, Vineet *et al.* Butyrate producers, “The Sentinel of Gut”: Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 2023a. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1103836>. Acesso em: 25 fev. 2024.

SINGH, Vineet *et al.* Butyrate producers, “The Sentinel of Gut”: Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 2023b. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1103836>. Acesso em: 25 fev. 2024.

SKIPWORTH, Richard J. E. *et al.* Mass spectrometric detection of candidate protein biomarkers of cancer cachexia in human urine. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 973–982, abr. 2010.

SLAVIERO, Kellie A.; CLARKE, Stephen J.; RIVORY, Laurent P. Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and

- pharmacodynamics of cancer chemotherapy. **The Lancet. Oncology**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 224–232, abr. 2003.
- SONG, Xujun *et al.* Possible Roles of Interleukin-4 and -13 and Their Receptors in Gastric and Colon Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 727, 13 jan. 2021.
- SONNENBERG, Gregory F.; ARTIS, David. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 698–708, jul. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.3892>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- SORBARA, Matthew T. *et al.* Functional and genomic variation between human-derived isolates of Lachnospiraceae reveals inter- and intra-species diversity. **Cell host & microbe**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 134-146.e4, 8 jul. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7351604/>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- STAVROU, George; KOTZAMPASSI, Katerina. Gut microbiome, surgical complications and probiotics. **Annals of Gastroenterology : Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 45–53, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5198246/>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- STRASSMANN, G *et al.* Suramin interferes with interleukin-6 receptor binding in vitro and inhibits colon-26-mediated experimental cancer cachexia in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 92, n. 5, p. 2152–2159, nov. 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC288393/>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- STRÖHLE, Alexander; ZÄNKER, Kurt; HAHN, Andreas. Nutrition in oncology: the case of micronutrients (review). **Oncology Reports**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 815–828, out. 2010.
- STRUCTURE, FUNCTION AND DIVERSITY OF THE HEALTHY HUMAN MICROBIOME. **Nature**, [S. l.], v. 486, n. 7402, p. 207–214, 13 jun. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564958/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- SUN, Xi-Zhen *et al.* Alteration of fecal tryptophan metabolism correlates with shifted microbiota and may be involved in pathogenesis of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 26, n. 45, p. 7173–7190, 7 dez. 2020.
- SZKARADKIEWICZ, Andrzej *et al.* Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, [S. l.], v. 2010, p. 901564, 2010.
- SZYCHOWIAK, Piotr *et al.* The role of the microbiota in the management of intensive care patients. **Annals of Intensive Care**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 3, 5 jan. 2022.
- TAN, Fengwei *et al.* Identification of Isocitrate Dehydrogenase 1 as a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Non-small Cell Lung Cancer by Proteomic Analysis. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, [S. l.], v. 11, n. 2, fev. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3277750/>. Acesso em: 29 jan. 2023.
- TANAKA, Atsushi; SAKAGUCHI, Shimon. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Cell Research**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 109–118, jan. 2017.
- TANIGUCHI, T. *et al.* Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**, [S. l.], v. 302, n. 5906, p. 305–310, 24 mar. 1983.
- THOMAS, Vincent; CLARK, James; DORÉ, Joël. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. **Future Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1485–1504, set. 2015. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.15.87>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- TIAN, Jun; CHEN, Jian-Shun. Nutritional status and quality of life of the gastric

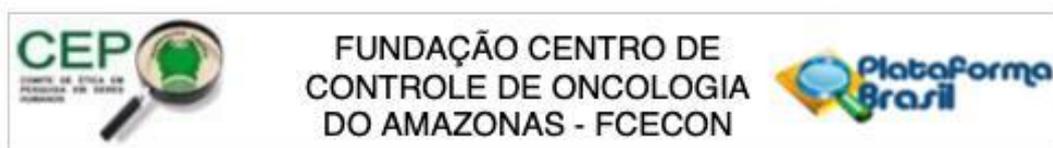
- cancer patients in Changle County of China. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1582–1586, 21 mar. 2005.
- TONETO, Marcelo *et al.* History of gastric cancer treatment: The pioneers, early misconceptions and the current guidelines. **Scientia Medica**, [S. l.], v. 22, p. 216–223, 1 jan. 2012.
- TOSO, Silvia *et al.* Bioimpedance vector pattern in cancer patients without disease versus locally advanced or disseminated disease. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 510–514, jun. 2003.
- TSAY, Jun-Chieh J. *et al.* Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 198, n. 9, p. 1188–1198, nov. 2018. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.201710-2118OC>. Acesso em: 26 fev. 2024.
- TSENG, Ching-Hung *et al.* Gastric microbiota and predicted gene functions are altered after subtotal gastrectomy in patients with gastric cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 20701, 10 fev. 2016.
- VELLOSO, Fernando J. *et al.* NOD-like receptors: major players (and targets) in the interface between innate immunity and cancer. **Bioscience Reports**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. BSR20181709, 9 abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6454022/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- VETERANS AFFAIRS TOTAL PARENTERAL NUTRITION COOPERATIVE STUDY GROUP. Perioperative total parenteral nutrition in surgical patients. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 325, n. 8, p. 525–532, 22 ago. 1991.
- VIAUD, Sophie *et al.* The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 342, n. 6161, p. 971–976, 22 nov. 2013.
- VILLAGRAN, Carmen *et al.* Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 y otras citocinas pro inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) en el plasma de pacientes con cáncer gástrico. **Ciencia, Tecnología y Salud**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 166–183, 1 dez. 2021a. Disponível em: <https://revistas.usac.edu.gt/index.php/cytes/article/view/1071>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- VILLAGRAN, Carmen *et al.* Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 y otras citocinas pro inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) en el plasma de pacientes con cáncer gástrico. **Ciencia, Tecnología y Salud**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 166–183, 1 dez. 2021b. Disponível em: <https://revistas.usac.edu.gt/index.php/cytes/article/view/1071>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- VINCENZI, Bruno *et al.* Predictive factors for chemotherapy-related toxic effects in patients with colorectal cancer. **Nature Clinical Practice. Oncology**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 455–465, ago. 2008.
- VUIK, FER *et al.* Composition of the mucosa-associated microbiota along the entire gastrointestinal tract of human individuals. **United European Gastroenterology Journal**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 897–907, ago. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6683645/>. Acesso em: 24 fev. 2024.
- WALSHAM, Natalie E.; SHERWOOD, Roy A. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, [S. l.], v. 9, p. 21–29, 2016.
- WANG, Jiunn-Wei *et al.* Fecal microbiota transplantation: Review and update. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi**, [S. l.], v. 118 Suppl 1, p. S23–S31, mar. 2019.
- WANG, Jun *et al.* PD-1, PD-L1 (B7-H1) and Tumor-Site Immune Modulation Therapy: The Historical Perspective. **Journal of Hematology & Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 34, 25 jan. 2017.

- WANG, Zhengguang *et al.* Activation of STAT3 in Human Gastric Cancer Cells via Interleukin (IL)-6-Type Cytokine Signaling Correlates with Clinical Implications. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. e75788, 7 out. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792128/>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- WAŚKIEL-BURNAT, Anna *et al.* The Role of Serum Th1, Th2, and Th17 Cytokines in Patients with Alopecia Areata: Clinical Implications. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 3397, dez. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3397>. Acesso em: 17 fev. 2024.
- WATERS, Jillian L.; LEY, Ruth E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. **BMC biology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 83, 28 out. 2019.
- WEIMANN, Arved *et al.* ESPEN guideline: Clinical nutrition in surgery. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 623–650, jun. 2017.
- WEINSTOCK, George M. Genomic approaches to studying the human microbiota. **Nature**, [S. l.], v. 489, n. 7415, p. 250–256, 13 set. 2012.
- WILLEMS, A. *et al.* Phenotypic and phylogenetic characterization of some Eubacterium-like isolates containing a novel type B wall murein from human feces: description of Holdemania filiformis gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 1201–1204, out. 1997.
- WILLHITE, David C.; BLANKE, Steven R. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 143–154, fev. 2004.
- WIRBEL, Jakob *et al.* Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 679–689, abr. 2019.
- WU, Gary D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 334, n. 6052, p. 105–108, 7 out. 2011.
- YACHIDA, Shinichi *et al.* Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 968–976, jun. 2019.
- YANG, Qiaoli *et al.* Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. **MicrobiologyOpen**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. e923, dez. 2019.
- YARZA, Pablo *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 635–645, set. 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3330>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- YIN, Shenglu *et al.* Expression of interleukin 1 β in gastric cancer tissue and its effects on gastric cancer. **OncoTargets and therapy**, [S. l.], v. 9, p. 31–35, 21 dez. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694683/>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- YUE, Min *et al.* Causal Effects of Gut Microbiota on Sleep-Related Phenotypes: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. **Clocks & Sleep**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 566–580, 12 set. 2023.
- ZEEVI, David *et al.* Structural variation in the gut microbiome associates with host health. **Nature**, [S. l.], v. 568, n. 7750, p. 43–48, abr. 2019.
- ZELLNER, G. *et al.* Anaerofilum pentosovorans gen. nov., sp. nov., and Anaerofilum agile sp. nov., two new, strictly anaerobic, mesophilic, acidogenic bacteria from anaerobic bioreactors. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 871–875, out. 1996.
- ZHANG, Xinmei *et al.* Alterations of Gastric Microbiota in Gastric Cancer and

- Precancerous Stages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 559148, 3 mar. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7966516/>. Acesso em: 3 mar. 2024.
- ZHANG, Xusheng *et al.* Tissue-resident Lachnospiraceae family bacteria protect against colorectal carcinogenesis by promoting tumor immune surveillance. **Cell Host & Microbe**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 418-432.e8, 8 mar. 2023. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/abstract/S1931-3128\(23\)00038-0](https://www.cell.com/cell-host-microbe/abstract/S1931-3128(23)00038-0). Acesso em: 28 fev. 2024.
- ZHOU, Wenyu *et al.* Longitudinal multi-omics of host–microbe dynamics in prediabetes. **Nature**, [S. l.], v. 569, n. 7758, p. 663–671, maio 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1236-x>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ZI, Mengli *et al.* A literature review on the potential clinical implications of streptococci in gastric cancer. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 2022a. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1010465>. Acesso em: 26 fev. 2024.
- ZI, Mengli *et al.* A literature review on the potential clinical implications of streptococci in gastric cancer. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 2022b. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1010465>. Acesso em: 26 fev. 2024.
- ZOETENDAL, Erwin G. *et al.* Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 870–873, ago. 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.142>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- ZOUIOUICH, Semi *et al.* Comparison of Fecal Sample Collection Methods for Microbial Analysis Embedded within Colorectal Cancer Screening Programs. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 305–314, 7 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-0188>. Acesso em: 1 mar. 2024.

ANEXOS

ANEXO 1 – COMPROVANTES ÉTICOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL, ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Pesquisador: ÁBNER SOUZA PAZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35379220.0.0000.0004

Instituição Proponente: Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.360.676

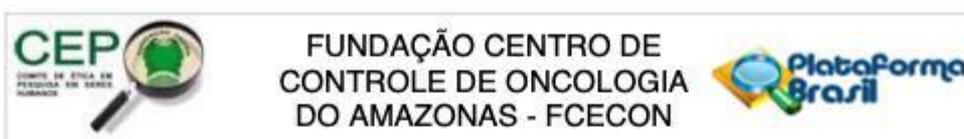
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de doutorado vinculado ao programa de Imunologia básica e aplicada da UFAM - PPGIBA. É um estudo clínico randomizado por conveniência. Farão parte 3 grupos de pacientes. Segundo o protocolo de pesquisa apresentado (PROJETO_DOUTORADO_2020_Abner.pdf postado em 08/10/2020) a população do estudo será constituída de pacientes de todos os gêneros, com idade entre 18 e 60 anos, candidatos a gastrectomias totais ou parciais, eletivas e controle saudável. Escolhidos para 3 grupos, sendo um grupo intervenção (G1) N=12 e um grupo controle convencional (G2) N=12. E um último grupo G3 (controle saudável N=12), com participantes saudáveis. O grupo 1, a intervenção seguirá com ingestão desde o 1º dia Pré-OP e até 7 dias pós-operatório de cápsulas de probióticos. O Grupo G2, seguirá com orientações nutricionais gerais. Será feita coleta de fezes antes, durante e após os 7 dias de seguimento. O Grupo G3, seguirá a ingestão de capsulas de probióticos por 7 dias durante o seguimento, sem intervenção cirúrgica. Trata-se de um estudo relevante que envolverá análise de variáveis do perfil metagenômico, nutricional, imunológico e conta com a parceria de empresas privadas para financiar parte do mesmo.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme o protocolo apresentado (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1580514.pdf) o objetivo geral é Avaliar a utilização do uso de probióticos perioperatórios na melhora do estado

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar
Bairro: S/N **CEP:** 69.040-010
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-4774 **E-mail:** comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br



Continuação do Parecer: 4.360.676

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOUTORADO_2020_Abner.pdf	08/10/2020 13:17:09	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP.pdf	08/10/2020 13:12:42	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Oficio_ao_CEP_Abner.pdf	08/10/2020 13:12:30	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ABNER_G1_G2.pdf	08/10/2020 13:12:13	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ABNER_G3.pdf	08/10/2020 13:11:17	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	28/09/2020 01:56:51	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	28/09/2020 01:56:40	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_rosto_Fcecon_2020.pdf	26/06/2020 17:24:32	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_INSTITUCIONAL_FCECON_2020.pdf	24/06/2020 16:44:52	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Outros	Declaracao_orientador.pdf	22/06/2020 00:37:07	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito
Declaração do Patrocinador	Cartas_patrocinios.pdf	22/06/2020 00:35:06	ÁBNER SOUZA PAZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 26 de Outubro de 2020

Assinado por:
Kátia Luz Torres Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Francisco Orellana, 215 - Planalto - 3º andar
 Bairro: S/N CEP: 69.040-010
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3655-4774 E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br

ANEXO 2 – REGISTRO DE ECR

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System

ClinicalTrials.gov Protocol Registration and Results System (PRS) Receipt
 Release Date: January 31, 2024

ClinicalTrials.gov ID: NCT06250075

Study Identification

Unique Protocol ID: 6.014.436

Brief Title: Effects of the Use of Probiotics on the Intestinal Microbiota of Patients With Gastric Cancer (PRONIC-G)

Official Title: Effects of the Use of Probiotics on the Intestinal Microbiota, Clinical-Nutritional and Immunological Status of Patients Gastrectomized for Gastric Cancer: A Randomized Clinical Trial

Secondary IDs:

Study Status

Record Verification: January 2024

Overall Status: Enrolling by invitation

Study Start: December 12, 2020 [Actual]

Primary Completion: August 4, 2022 [Actual]

Study Completion: March 31, 2024 [Anticipated]

Sponsor/Collaborators

Sponsor: Universidade Federal do Amazonas

Responsible Party: Principal Investigator
 Investigator: Abner Souza Paz, RD [aspaz]
 Official Title: Principal Investigator
 Affiliation: Universidade Federal do Amazonas

Collaborators:

Oversight

U.S. FDA-regulated Drug: No

U.S. FDA-regulated Device: No

U.S. FDA IND/IDE: No

Human Subjects Review: Board Status: Approved
 Approval Number: 6.014.436
 Board Name: FCECON HUMAN RESEARCH ETHICS COMMITTEE
 Board Affiliation: National Research Ethics Commission (Conep)
 Phone: +55(61) 3315-5878
 Email: cns@saude.gov.br
 Address:

ANEXO 3 – REGISTRO REBEC

BRASIL



Estudo publicado

RBR-5vyr8bp Evaluation of the use of Probiotics in the intestinal flora, nutritional status and immune system of patients who underw...

Data de registro: 23/08/2022 (dd/mm/yyyy)

Última data de aprovação: 23/08/2022 (dd/mm/yyyy)

Tipo de estudo:

Intervenções

Título científico:

en

Effects of the use of Probiotics on the gut microbiota, clinical-nutritional and immunological status of patients undergoing Gastrectomy for Gastric Cancer: a randomized clinical trial

pt-br

Efeitos do uso de Probióticos na microbiota intestinal, estado clínico-nutricional e imunológico de pacientes Gastrectomizados por Câncer Gástrico: Um ensaio clínico randomizado

es

Effects of the use of Probiotics on the gut microbiota, clinical-nutritional and immunological status of patients undergoing Gastrectomy for Gastric Cancer: a randomized clinical trial

Identificação do ensaio

- Número do UTN: U1111-1266-9980
- Título público:

en

Evaluation of the use of Probiotics in the intestinal flora, nutritional status and immune system of patients who underwent Surgery to Remove the Stomach for Gastric Cancer

pt-br

Avaliação do uso de Probióticos na flora intestinal, estado nutricional e sistema imunológico de pacientes que realizaram Cirurgia de Retirada do Estômago por Câncer Gástrico

- Acrônimo científico:

- Acrônimo público:

- Identificadores secundários:

- 35379220.0.0000.0004

Orgão emissor: Plataforma Brasil

- 4.360.676

Orgão emissor: Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas - FCECON

Patrocinadores

- Patrocinador primário: UFAM- Universidade Federal do Amazonas

- Patrocinador secundário:

- Instituição: FCECON - Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

ANEXO 4 – PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS – SUBMISSÕES

BRASPEN Journal

Visualização

De: revista@braspen.org
Para: abpaznutri@gmail.com, abnernutri@hotmail.com
CC:
Assunto: BRASPEN Journal - Manuscript ID BRASPENJ-2024-0013
Corpo: 04-abr-2024

Dear Prof. Paz:

Your manuscript entitled "PERFIL NUTRICIONAL DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS POR CÂNCER GÁSTRICO EM USO DE PROBIÓTICOS NO AMAZONAS" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the BRASPEN Journal.

Your manuscript ID is BRASPENJ-2024-0013.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/braspenj> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/braspenj>.

Thank you for submitting your manuscript to the BRASPEN Journal.

Sincerely,
BRASPEN Journal Editorial Office

Data do envio: n/d

ANEXO 5 – PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS – CARTA DE ACEITE



**REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
NÚCLEO DO CONHECIMENTO
ISSN: 2448-0959**

O artigo intitulado: "Effects of the use of probiotics on the intestinal microbiota, clinical-nutritional and immunological status of patients gastrectomies for gastric cancer: A clinical trial protocol" submetido por Ábner Souza Paz e co-autores: Agnes Monteiro de Carvalho, Allyson Guimarães Costa, Anita Rachel Silva Pimentel, Bruno Mori, Claudio Lucas dos Santos Catão, Gloria Alves Lima, Jhonnatan Silva de Souza, José Fernando Marques Barcellos, Thalita Souza Mendes, Valquíria do Carmo Alves Martins e William Hiromi Fuzita, foi aceito para processamento na Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento e está em processo de avaliação para posterior publicação.

São Paulo, 17 de Março de 2024.

Atenciosamente;

Adriana Santos - Central de atendimento / Brasil
Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento
www.nucleodoconhecimento.com.br

Effects of the use of probiotics on the intestinal microbiota, clinical-nutritional and immunological status of patients gastrectomies for gastric cancer: A clinical trial protocol

Ábner Paz ^{1,2,4*}, Agnes Carvalho ², Allyson Costa ^{1,3}, Anita Pimentel ² Bruno Mori ¹ Claudio Catão ³,
Gloria Lima ², Jhonnatan Souza ^{1,2}, José Fernando Barcellos¹, Thalita Mendes ², Valquíria Martins ²
and William Fuzita ⁴.

¹ Federal University of Amazonas; Av. General Rodrigo Otávio, 1200-Coroado, Manaus-AM

² Amazonas Oncology Control Center Foundation ; Rua Francisco Orellana, 215-Planalto, Manaus-AM

³ Hospital Foundation of Hematology and Hemotherapy of Amazonas: Av. Constantino Nery, 4397-Manaus-AM

⁴ Sensumed Teaching and Research Institute: Rua Marciano Armound, 545-Adrianópolis, Manaus-AM

* Correspondence: abpaznutri@gmail.com

Abstract: Gastrectomy resulting from gastric cancer modifies the intestinal bi-ome, this modifying potential deserves scientific knowledge. This article aims to describe the protocol of a randomized clinical trial and the baseline results of anthropometric variables, nutritional status, pro-inflammatory cytokines, microbiota profile, and use of perioperative probiotics on the clinical-nutritional and immunological status of patients. gastrectomized for gastric cancer. This 3-year exploratory project is being extended by the Amazonas Oncology Control Center Foundation-FCECON. A randomized, controlled, single-blind, two-arm intervention study will be carried out, with 100 patients of both genders, aged 18 years and over, candidates for elective total or partial gastrectomies and a healthy negative control. Chosen for 5 groups, an intervention group (G1) N=12, a conventional control group (G2) N=12. Group G3 (N=12), with healthy participants. Finally, two groups G4 and G5 (N=64), where will only evaluate the clinical stages. Between December 2021 and May 2022, 24 patients were evaluated, mean age of 58.8±14.4 years, male (70.8%), with adenocarcinoma (83.3%), undergoing gastrectomy total (75.0%), with staging according to the TNM global assessment method for tumors, a high stage (T3 and T4).

Keywords: Gastric Neoplasms; Cancer; Gastrointestinal Microbiome; Nutritional status; Immunological Factors.

APÊNDICES**APÊNDICE A – DECLARAÇÃO SOBRE O USO E DESTINAÇÃO DO MATERIAL
E/OU DADOS COLETADOS****UFAM**

Declaro que todos os dados coletados serão utilizados exclusivamente para a realização deste projeto de pesquisa e publicados em revista científica.

As informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o participante da pesquisa, garantindo a confidencialidade e privacidade, além de cumprir todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Resolução n.º. 466/2012 e complementares.

Manaus, 11 de maio de 2020.

A handwritten signature in blue ink, reading "José Fernando Marques Barcellos".

Coordenador da pesquisa
Jose Fernando Marques Barcellos, Dr.
Professor Titular - Morfologia
ICB/UFAM

**APÊNDICE B – DECLARAÇÃO DE QUE OS RESULTADOS DA PESQUISA
SERÃO TORNADOS PÚBLICOS, SEJAM FAVORÁVEIS OU NÃO**



Declaro para devidos fins, que os resultados desta pesquisa serão tornados públicos, assim que todos os dados sejam coletados, sendo estes favoráveis ou não.

Manaus, 11 de maio de 2020.



Coordenador da pesquisa
Jose Fernando Marques Barcellos, Dr.
Professor Titular -Morfologia
ICB/UFAM



APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO

QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO

1. Dados Sociais

Iniciais do Nome do Paciente: _____ Nº

Prontuário _____

DN: ____/____/____ Idade: _____(anos)

Endereço: _____ CEP: _____

Telefone: () _____

Qual estado do Brasil você nasceu? _____

Sua cor? (deve ser a opinião do entrevistador)

() Branco () Pardo () Preto () Amarelo

2. Qual renda atual da sua família? (somar todos os salários da

casa): _____(reais/mês).

Quantas pessoas moram com você?: _____

3. Qual sua escolaridade?

() primário completo(ate 4ª série)

() primário incompleto (< 4ª serie)

() ensino fundamental completo(ate 8ª serie)

() ensino fundamental incompleto (<8ª serie)

() ensino médio completo

() ensino médio incompleto

() superior completo

() superior incompleto

() pós graduado(Esp,MSc,Dr)

Informações sobre saúde

Tem alguma outra doença? () não () sim, qual? _____

Tem histórico de câncer na família? () Não () Sim, Qual ? _____

() Não sabe informar

Costuma comer comida industrializada? () Não () Sim

Fuma? () Não () Sim, Quantos maços por dia? _____

Toma Bebidas alcoólicas? () Não () Sim, Qual tipo? _____

Come Muita carne vermelha/processada (salsicha, calabresa, linguiça)? () Não

() Sim, Quantas vezes por semana? _____

Tem histórico de câncer gástrico familiar? () Sim () Não

Seu tipo sanguíneo é A+ ? () Sim () Não

Avaliador Treinado: _____

Revisão Pesquisador: _____

APÊNDICE D – RECORDATÓRIO ALIMENTAR - 24H



RECORDATÓRIO ALIMENTAR - 24H

REFEIÇÃO	HORA	ALIMENTO	QUANTIDADE
Café da manhã			
Lanche da manhã			
Almoço			
Lanche			
Jantar			
Ceia			
Resultado da Ingestão alimentar			

Leito: _____ Data: ___ / ___ / ___

Dieta: () V.O () TNE/TNP

APÊNDICE E – INSTRUMENTO PARA COLETA DE ANTROPOMETRIA



INSTRUMENTO PARA COLETA DE ANTROPOMETRIA

Leito: _____ Grupo _____

EXAME	ADEQUAÇÃO	1ª MEDIDA-Pré OP Data: __/__/__	2ª MEDIDA Pós-OP Data: __/__/__
PESO(kg) PH(kg)			
ALTURA(cm)			
%PERDA PESO			
IMC(kg/m ²)			
CB(cm)* CMB			
DCT(mm)*			
EMAP(mm)*			

*coleta deve ser realizada sempre no lado dominante do participante.

APÊNDICE F – INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA



INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Leito: _____ Grupo _____

EXAME	VALOR REF.	1ª medida (pré-op) Data: __/__/__	2ª medida (pós-op) Data: __/__/__
Hemácias			
Hemoglobina			
Hematócrito			
Leucócitos Totais			
Linfócitos Totais			
CTLP			
Calprotectina fecal			
IL-6			
TNF-alfa			

Avaliador: _____

APÊNDICE G – BIOIMPEDÂNCIA – BIODYNAMICS 450
PROTOCOLO PARA TESTE DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA



Bioimpedância – Biodynamics 450
PROTOCOLO PARA TESTE DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA

1. Nome do Paciente: _____ Leito: _____ Data: ____/____/____

2. Portador de Marca-passo? (Se sim, não realizar o teste)

() Sim () Não

3. Tomou diurético 12 horas antes do teste? (Se sim, realizar teste no dia seguinte)

() Sim () Não

4. Tomou Café, Chá-mate, Chocolate, Bebidas Alcoólicas, no dia anterior? (Se sim, realizar teste no dia seguinte)

() Sim () Não

5. Só realizar teste a pacientes informar que menstruou uma semana antes ou uma semana depois do dia de hoje. Caso contrario, remarcar o teste para a data adequada.

Data da ultima menstruação: ____/____/____ (se mulheres)

Data provável da próxima menstruação: ____/____/____

Antes de iniciar o teste;

- Deitar o paciente e aguardar 3 minutos para distribuição hídrica corporal;
- Colocar o eletrodo preto do lado direito do pé acima do 3º dedo;
- Colocar o eletrodo vermelho na direção do tornozelo, na mesma posição do 3º dedo do pé;
- Na mão do braço direito, colocar o eletrodo preto acima do 3º dedo;
- No punho do braço direito, colocar o eletrodo vermelho na mesma posição do dedo da mão;
- Os eletrodos só podem ser utilizados uma única vez.

Dados Coletados da Bioimpedância Elétrica- Biodynamics 450.

Peso Total: _____(kg) Altura: _____(cm)

Resistência: _____(ohms) Reatância: _____(ohms) AF: _____(º) AFP: _____(º)

Massa Celular Corporal: _____(kg)/_____(%) Massa Extracelular: _____(kg)/_____(%)

Massa Magra: _____(kg)/_____(%) Massa Gorda: _____(kg)/_____(%)

Relação ME/MCC: _____ TMB: _____ (cals) IMC: _____(kg/m²)

ACT/MM: _____(%)

Água Intracelular: _____(kg)/_____(%) Água Extracelular: _____(kg)/_____(%) ACT: _____(kg)

**APÊNDICE H – FICHA DE COLETA DE DADOS AVALIAÇÃO CIRÚRGICA
(COMPLICAÇÕES-PÓS-OP)**

	FICHA DE COLETA DE DADOS AVALIAÇÃO CIRÚRGICA (COMPLICAÇÕES-PÓS-OP)	
Iniciais do nome do paciente: _____		Data da Coleta: __/__/__
Data de Nascimento: __/__/__	Idade: _____	
N. do Registro: _____	Leito: _____	
Diagnóstico Cirúrgicos: _____		
Intercorrências pós-operatórias: _____		
Cirurgião: _____		
Data de Admissão Hospitalar: ____/____/____		
AVALIAÇÃO DE COMPLICAÇÕES		
Complicações Infecciosas: () Não, () Sim, Quais? Onde? _____		
Antibióticos: () Não, () Sim, Quais? _____ (Duração: _____)		
Profilático () Terapêutico ()		
Complicações Gerais: _____		
Óbito? () Sim, Data: __/__/__. () Não, Obs: _____ Data da Alta: __/__/__		
Tempo de Internação: _____ dias.		

Avaliador _____

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G1 E G2**PPGIBA**Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G1 e G2**

Convidamos o(a) Sr.(a) _____, portador(a) do RG: _____, para participar do estudo “EFEITOS DO USO DE PROBIOTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL, ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO” do pesquisador principal Prof. Mestre Ábner Souza Paz e Orientador/Coordenador Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos e equipe. Neste estudo serão coletadas informações a partir de entrevistas com o (a) senhor (a) e também por meio de coletas de dados no seu prontuário. O estudo tem por finalidade verificar como está seu intestino antes da cirurgia e como ele reagirá após a sua cirurgia, bem como o seu estado nutricional.

Primeiramente o (a) sr. (a) será entrevistado (a) no dia da sua internação em um local reservado, para sabermos como está seu estado nutricional (alimentação, e medidas corporais) e seus dados pessoais em no máximo 15 minutos, usaremos para isso, dois formulários simples e diretos que deverão ser respondidos pelo sr. (a) com ajuda dos pesquisadores. Em seguida de acordo com o dia da semana o senhor(a) será incluído no grupo correspondente. O (a) sr. (a) terá chances iguais de ser selecionado(a) para fazer parte de qualquer um dos grupos de nossa pesquisa. Independente do grupo que o(a) senhor(a) for colocado o(a) senhor(a) irá fazer duas coletas de fezes para examinar o seu intestino, uma um dia antes da cirurgia e outra 7 após a cirurgia. Os grupos da pesquisa são: **Grupo 1: cirurgia + ingestão de 2 cápsulas (uma cápsula pela manhã e uma pela noite) de suplemento para o intestino (probióticos)+ orientações nutricionais direcionadas ao seu tratamento. Grupo 2: cirurgia + orientações nutricionais direcionadas para o seu tratamento.** Após a seleção o senhor(a) será orientado(a) pela equipe sobre como será sua participação no seu grupo. O estudo será realizado durante sua estadia na Fundação Cecon-FCECON, caso o senhor(a) receba alta antes dos 7 dias da

pesquisa, poderá terminar seu tratamento em casa e um membro da equipe de pesquisa irá entrar em contato com o(a) senhor(a). Os benefícios desta pesquisa podem ser diretos a vocês participantes deste estudo e podem também no futuro ajudar outros pacientes que deverão se beneficiar de um novo tratamento para reduzir os efeitos colaterais da cirurgia e até melhorar o estado nutricional.

Quanto aos riscos da pesquisa, os eventuais constrangimentos e vazamento de informações sigilosas serão evitados e/ou minimizados para manter o bem-estar do (a) sr(a) por meio de treinamento e acompanhamento da equipe de pesquisa. Consideramos também como riscos do uso de suplementos para o intestino (probióticos), o aparecimento de distensão abdominal (empachamento) ou diarreia (disenteria). Caso isso ocorra, suspenderemos o tratamento na hora da sua queixa e daremos o suporte médico adequado ao caso. O (a) sr. (a) como participante desta importante pesquisa poderá recusar-se a participar desse estudo ou retirar sua permissão/consentimento a qualquer momento, sem que com isso sofra qualquer tipo de represália, penalização ou prejuízo a seu cuidado, podendo ainda pedir para retirar todos os seus dados e exames coletados, sem nenhum custo para o(a) senhor(a). Ainda **resguardamos o(a) senhor(a)** de que se houver algum dano em decorrência **desta pesquisa**, o senhor poderá buscar indenização conforme lei vigente. A equipe de saúde da FCECON e o pesquisador principal, dará suporte nos casos de danos emocionais e físicos decorrentes da pesquisa, o tempo que for necessário. A equipe de pesquisa também tomará todas as medidas de prevenção a covid-19, conforme o ministério da Saúde, e para sua segurança todos os equipamentos serão higienizados com álcool a 70% antes e depois da utilização, será usado máscara, avental e luvas para sua proteção.

Para qualquer outra informação, o(a) sr (a). poderá entrar em contato com o pesquisador principal citado neste documento no ambulatório da FCECON no piso térreo, consultório 12 às segundas das 14h as 17h ou no CEP/FCECON situado na rua Francisco Orellana, 215- Planalto. Horário de atendimento para público em geral e pesquisadores: Das 08:00h as 12:00h (terças e quintas), no 3º andar da FCECON. Fone do CEP / FCECON: (92) 3655-4773, E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br ou pelo celular do **Pesquisador Principal: (92) 99147-2235** no mesmo endereço acima.

Estou cedendo uma via de igual teor deste documento, assinada.

Assinatura do participante

ou



impressão digital

Pesquisador principal

Manaus ____/____/____

APÊNDICE J – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G3

PPGIBA
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G3

Convidamos o(a) Sr.(a) _____, portador(a) do RG: _____, para participar do estudo “EFEITOS DO USO DE PROBIOTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL, ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO” do pesquisador principal Prof. Mestre Ábner Souza Paz e Orientador/Coordenador Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos e equipe. Neste estudo serão coletadas informações a partir de entrevistas com o (a) senhor (a) e também por meio de coletas dos seus dados. O estudo tem por finalidade verificar como está seu intestino e como ele reagirá após a suplementação de probióticos (suplementos para melhorar a flora intestinal) bem como o seu estado nutricional. O estudo envolve 3 grupos, o Grupo 01 e 02- pacientes operados por câncer de estomago e Grupo 03- pessoas saudáveis funcionários da FCECON.

Primeiramente o (a) sr. (a) será convidado e entrevistado (a) em um consultório do ambulatório de modo reservado, no dia em que o senhor(a) concordar em participar do nosso projeto, para sabermos como está seu estado nutricional (medidas corporais e alimentação e exame de sangue) e seus dados pessoais em no máximo 15 minutos, usaremos para isso, dois formulários simples e diretos que deverão ser respondidos pelo sr. (a) com ajuda dos pesquisadores. O (a) sr. (a) participará do Grupo 3- grupo de participantes saudáveis funcionários da FCECON. Para o senhor entender melhor: O seu Grupo é o 3, e o senhor (a) fará a ingestão de 2 cápsulas ao dia (uma cápsula pela manhã e uma pela noite) de suplemento para o intestino (probióticos), por 7 dias. O(a) senhor(a) será orientado(a) pela equipe sobre como será sua participação em detalhes, sem que reste dúvidas ao senhor (a). O estudo será realizado na Fundação Cecon-FCECON. Os benefícios desta pesquisa podem ser diretos a você participante

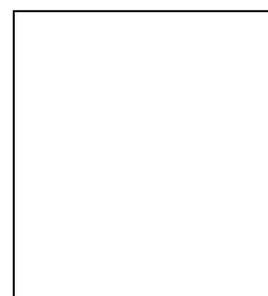
deste estudo e podem também no futuro ajudar outras pessoas que deverão se beneficiar de um novo protocolo para melhorar o intestino e o estado nutricional.

Quanto aos riscos da pesquisa, os eventuais constrangimentos e vazamento de informações sigilosas serão evitados e/ou minimizados para manter o bem-estar do (a) sr(a) por meio de treinamento e acompanhamento da equipe de pesquisa. Consideramos também como riscos do uso de suplementos para o intestino (probióticos), o aparecimento de distensão abdominal (empachamento) ou diarreia (disenteria). Caso isso ocorra, suspenderemos o estudo na hora da sua queixa e daremos o suporte médico adequado ao caso. O (a) sr. (a) como participante desta importante pesquisa poderá recusar-se a participar desse estudo ou retirar sua permissão/consentimento a qualquer momento, sem que com isso sofra qualquer tipo de represália, penalização ou prejuízo, podendo ainda pedir para retirar todos os seus dados e exames coletados, sem nenhum custo para o(a) senhor(a). Ainda resguardamos o(a) senhor(a) de que se houver algum dano em decorrência desta pesquisa, o senhor poderá buscar indenização conforme lei vigente. A equipe de saúde da FCECON e o pesquisador principal, dará suporte nos casos de danos emocionais e físicos decorrentes da pesquisa, o tempo que for necessário. A equipe de pesquisa também tomará todas as medidas de prevenção a covid-19, conforme o ministério da Saúde, e para sua segurança todos os equipamentos serão higienizados com álcool a 70% antes e depois da utilização, será usado máscara, avental e luvas para sua proteção.

Para qualquer outra informação, o(a) sr (a). poderá entrar em contato com o pesquisador principal citado neste documento no ambulatório da FCECON no piso térreo, consultório 12 às segundas das 14h as 17h ou no CEP/FCECON situado na rua Francisco Orellana, 215- Planalto. Horário de atendimento para público em geral e pesquisadores: Das 08:00h as 12:00h (terças e quintas), no 3º andar da FCECON. Fone do CEP / FCECON: (92) 3655-4773, E-mail: comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br ou pelo celular do Pesquisador Principal: (92) 99147-2235 no mesmo endereço acima.

Estou cedendo uma via de igual teor deste documento, assinada.

Assinatura do participante



ou

impressão digital

Pesquisador principal

Manaus_____/_____/_____

APÊNDICE K – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-G4/G5

Convidamos _____ o(a)
Sr.(a) _____, portador(a)
do RG: _____, para participar do estudo “EFEITOS DO USO DE PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL, ESTADO CLÍNICO-NUTRICIONAL E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES GASTRECTOMIZADOS POR CÂNCER GÁSTRICO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO” do pesquisador principal Prof. Mestre Ábner Souza Paz e Orientador/Coordenador Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos e equipe. Neste estudo serão coletadas informações a partir de entrevistas com o (a) senhor (a) e também por meio de coletas de dados no seu prontuário. O estudo tem por finalidade verificar como está seu intestino antes da cirurgia e como ele reagirá após a sua cirurgia, bem como o seu estado nutricional.

Primeiramente o (a) sr. (a) será entrevistado (a) no dia da sua internação em um local reservado, para sabermos como está seu estado nutricional (medidas corporais e alimentação, exame de sangue e fezes) e seus dados pessoais em no máximo 15 minutos, usaremos para isso, dois formulários simples e diretos que deverão ser respondidos pelo sr. (a) com ajuda dos pesquisadores. Em seguida de acordo com o processo de escolha, o senhor(a) será incluído no grupo correspondente. O (a) sr. (a) terá chances iguais de ser selecionado(a) para fazer parte de qualquer um dos grupos de nossa pesquisa, no entanto o(a) senhor(a) não saberá qual grupo o(a) senhor(a) pertencerá. Independente do grupo que o(a) senhor(a) for colocado, iremos acompanhar o senhor(a) depois da cirurgia para verificar quais os sintomas e se houve alguma complicação da cirurgia, durante 7 dias após a cirurgia ou até a sua alta. Os seus dados e materiais coletados serão usados **apenas** para esta pesquisa, sendo descartados (jogados no lixo) após avaliação. Os grupos da pesquisa são: **Grupo G4: cirurgia + ingestão de 1 cápsula (uma cápsula pela manhã por 7 dias) de suplemento para o intestino (probióticos de marca 20 BI-FQM) ou Grupo G5: cirurgia + ingestão de 1 cápsulas ao dia por 7 dias de placebo com carbonato de cálcio 0,5g pela manhã.** Após a seleção o senhor(a) será orientado(a) pela equipe sobre como será sua participação no seu grupo. O estudo será realizado durante sua estadia na Fundação Cecon-FCECON, caso o

senhor(a) receba alta antes dos 7 dias da pesquisa, poderá terminar seu tratamento em casa e um membro da equipe de pesquisa irá entrar em contato com o(a) senhor(a). Os benefícios desta pesquisa podem ser diretos a você participante deste estudo e podem também no futuro ajudar outros pacientes que deverão se beneficiar de um novo tratamento para reduzir os efeitos colaterais da cirurgia e até melhorar o estado nutricional.

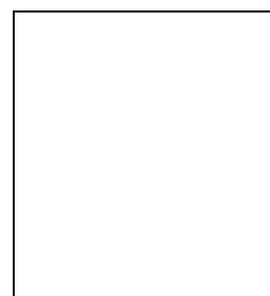
Quanto aos riscos da pesquisa, os eventuais constrangimentos e vazamento de informações sigilosas serão evitados e/ou minimizados para manter o bem-estar do (a) sr(a) por meio de treinamento e acompanhamento da equipe de pesquisa. Consideramos também como riscos do uso de suplementos para o intestino no grupo G4 (probióticos), o aparecimento de distensão abdominal (empachamento) ou diarreia (disenteria). Ainda sobre os riscos para o grupo G5, que fará uso de placebo com Carbonato de Calcio 0,5 g, o senhor(a) pode ter enjoos, gastura na barriga, coceira leve, vermelhidão. Em casos raros, gases, diarreias ou prisão de ventre, se isso acontecer, suspenderemos o uso e faremos as medidas médicas cabíveis com orientação de um médico da equipe, e excluiremos o(a) senhor(a) da pesquisa, sem, no entanto, deixar de lhe dar assistência necessária até que os sintomas desapareçam. O (a) sr. (a) como participante desta importante pesquisa poderá recusar-se a participar desse estudo ou retirar sua permissão/consentimento a qualquer momento, sem que com isso sofra qualquer tipo de represália, penalização ou prejuízo a seu cuidado, podendo ainda pedir para retirar todos os seus dados e exames coletados, sem nenhum custo para o(a) senhor(a). Ainda **resguardamos o(a) senhor(a)** de que se houver algum dano em decorrência **desta pesquisa**, o senhor poderá buscar indenização conforme lei vigente. A equipe de saúde da FCECON e o pesquisador principal, dará suporte nos casos de danos emocionais e físicos decorrentes da pesquisa, o tempo que for necessário. a equipe de pesquisa também tomará todas as medidas de prevenção a covid-19, conforme o ministério da Saúde, e para sua segurança todos os equipamentos serão higienizados com álcool a 70% antes e depois da utilização, será usado máscara, avental e luvas para sua proteção.

Para qualquer outra informação, o(a) sr (a). poderá entrar em contato com o pesquisador principal citado neste documento no ambulatório da FCECON no piso térreo, consultório 12 às terças das 13h as 17h ou no CEP/FCECON situado na rua Francisco Orellana, 215- Planalto. Horário de atendimento para público em geral e pesquisadores: Das 08:00h as 12:00h (terças e quintas), no 3º andar da FCECON.

Fone do CEP / FCECON: (92) 3655-4773, E-mail:
comite.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br ou pelo celular do Pesquisador Principal:
(92) 99147-2235 no mesmo endereço acima.

Estou cedendo uma via de igual teor deste documento, assinada.

Assinatura do participante



ou

impressão digital

Pesquisador principal

Manaus_____/_____/_____

Soma-se:

Total: Cálculo:

08 Amostras

09 Curva

01 CN

2 tubos (segurança) – Para não faltar reagente 20 tubos

20 tubos x 25 (quantidade do pool de BEADS que eu vou colocar em cada tubo) =

500

$500 / 07$ (Número de BEADS que vou utilizar) = 72 μ L

Vou pegar 72 μ L de cada BEAD.

*Guardar todos os tubos em estantes e protegidos da poeira

- **Preparo das amostras e Reagentes “G” e “F” (Dia do experimento)**

I. Descongelar as amostras em banho maria (37°C). Centrifugar por 10 min. a 14.000 rpm. Utilizar este mesmo procedimento se precisar diluir as amostras, caso seja necessário. Utilizar o REAGENTE G do kit para diluição.

II. Colocar os Reagentes G e F em tubo falcon e centrifugar por 10 min. a 2.000 rpm. Obs: É importante aliquotar os reagentes no fluxo laminar para não contaminar, ainda mais se for usar novamente o kit.

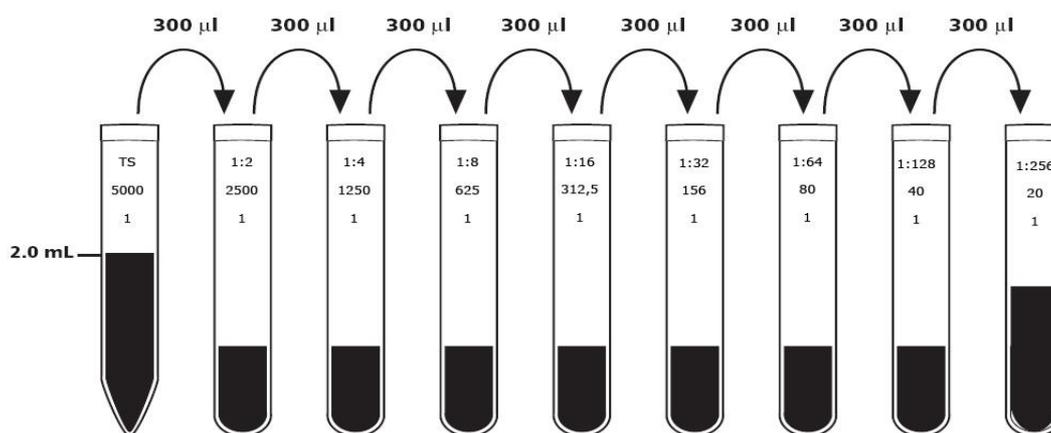
III. Retirar os tubos identificados e deixar todos prontos para o início do experimento, separar pipetas, ponteiras, descartes, etc.

- **Preparo dos Padrões**

I. Reconstituir o padrão 15 minutos antes de começar o experimento. O padrão deve ser reconstituído com 2,0 mL do REAGENTE G. Após abrir o padrão, colocar 1,0 mL do REAGENTE G e agitar bem lentamente e com movimentos circulares por uns 5 minutos. Colocar mais 1000 μ L do REAGENTE G e continuar mexendo bem suavemente. Com uma pipeta, passar o padrão para o TUBO TS “1”. Colocar mais 1,0 mL (REAG. G) para lavar o recipiente do padrão e com a pipeta transferir para o TUBO TS “1” Repetir o procedimento com mais 1000 μ L (REAG. G). Por 15 minutos

ficar mexendo bem suavemente de tempo em tempo para solubilizar bem. OBS: Nunca vortexar o padrão e nem agitar fortemente.

II. Colocar 300 μL do REAGENTE G em cada tubo da curva de diluição “1” exceto no tubo TS (tubo com as citocinas liofilizadas) que está com o padrão. Fazer as diluições sucessivas conforme exemplo abaixo:



No tubo CN colocar apenas o REAGENTE “G”.

• Preparo do pool de BEADS

- I. Pegar o cálculo de quanto você vai precisar utilizar das BEADS (Ex. 72 μL);
- II. Colocar 72 μL de cada BEAD (reagentes A1 – A5 do kit) no Tubo “BD”.
Obs: Vortexar bastante as BEADS toda vez que for tirá-las. Se demorar a tirar, vortexar novamente.
- III. Utilizaremos 25 μL do pool de BEADS para cada tubo de amostra, curva de diluição “2” e controle negativo (CN).

• Execução das reações

- I. Colocar 25 μL do pool de BEADS em cada tubo da curva de diluição “2”. Não esquecer de vortexar as BEADS de tempo em tempo;
- II. Colocar 25 μL do pool de BEADS em todos os tubos das amostras e no tubo CN, sempre vortexando as BEADS;
- III. Colocar 25 μL do padrão dos tubos da curva de diluição “1” nos tubos da curva de diluição “2”. Colocar respeitando as respectivas diluições;

- IV. Colocar 25 μ L de amostra nos seus respectivos tubos. É importante pegar somente o sobrenadante dos tubos;
- V. Colocar 25 μ L do REAGENTE G no tubo CN;
- VI. Colocar 25 μ L do REAGENTE “B”(anticorpo de detecção) em cada tubo. Tanto nos tubos da curva de diluição “2”, quanto nos das amostras e CN;
- VII. Vortexar todos os tubos;
- VIII. Incubar por 3h à T.A. e ao abrigo da luz;
- IX. Após incubação, adicionar 1 mL do ‘REAGENTE “F” em cada tubo;
- X. Centrifugar os tubos por 5 min. a 1.500 rpm, 20°C;
- XI. Verter os tubos e adicionar 200 μ L do REAGENTE “F” em cada tubo;
- XII. Vortexar todos os tubos e proceder à leitura.

• Preparo do Setup

- I. Identificar um tubo para o Setup Beads com a sigla “Setup”;
 - II. Colocar 50 μ L do Cytometer Setup Beads no tubo.
- Obs: Vortexar bastante o frasco com Cytometer Setup Beads antes de tirá-las;
- III. Colocar 450 μ L de “Reagente F” no tubo e vortexar.

• Aquisição setup, padrões e amostras no citômetro

- I. Criar 2 pastas: “Standard” e “Samples”. Pode adquirir todas as amostras em uma única pasta e depois separar as 10 primeiras para a pasta Standard e o restante para a Samples;
- II. Abrir o Template de aquisição do CBA;
- III. Conectar o citômetro e acionar os parâmetros do instrumento determinado após calibração do aparelho. Certificar que no item “Aquisition and Storage” a resolução do canal está em 1024;
- IV. Ajustar o número de eventos a serem contados para 2.100 em R1 (300 beads de cada analito);
- V. Colocar o nome do arquivo no item FILE com caracteres alfanuméricos. Exemplo: As iniciais de quem está fazendo o experimento e data do dia do procedimento. Ex: JP02052008.001;
- VI. Identificar os padrões e amostras no item SAMPLE ID. Ex: Padrões: CN; 1:256; 1:128, etc. Amostras: 01, 02, 03, etc.;

- VII.** Assegurar que a gate R1 está delimitando todas as beads. Acionar a velocidade High;
- VIII.** Começar a leitura com o Setup. Realizar os ajustes na voltagem que forem necessários;
- IX.** Iniciar a aquisição da curva com o tubo CN e depois em ordem crescente de concentração dos padrões, ou seja, ler da maior diluição para a menor até o tubo TS;
- X.** Seguir a aquisição das amostras em ordem crescente.