

Eixo Oral-Gástrico-Intestinal na Neoplasia Gástrica: Potenciais Biomarcadores

Oral-Gastric-Gut Axis in Gastric Neoplasia: Potential Biomarkers

Catarina Lopes Ferreira

ORIENTADO POR: Professora Doutora Conceição Calhau

TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO

I.º CICLO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO | UNIDADE CURRICULAR ESTÁGIO

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO PORTO

TC

Porto, 2026



Resumo

A comunicação entre as comunidades microbianas ao longo do trato digestivo é cada vez mais reconhecida como um fator determinante para a saúde e a doença humanas. Evidência crescente sugere que a interação da microbiota ao longo do eixo oral-gástrico-intestinal pode contribuir para a carcinogénese gástrica, não apenas através de alterações na composição da microbiota, mas também por alterações da sua atividade metabólica. Entre os fatores de origem microbiana envolvidos em processos carcinogénicos, destacam-se a β -glicuronidase e o ácido desoxicólico, uma das principais classes de ácidos biliares secundários.

Este estudo tem como objetivo investigar a atividade da β -glicuronidase microbiana e os níveis séricos de ácido desoxicólico como potenciais biomarcadores funcionais associados a neoplasia gástrica e a lesões gástricas pré-neoplásicas. Para tal, foram recolhidas amostras biológicas de indivíduos submetidos a endoscopia digestiva alta e estabelecidos protocolos analíticos para a quantificação destes marcadores.

Ao focar-se em padrões funcionais da microbiota, este trabalho procura contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos que relacionam a disbiose ao longo do eixo oral-gástrico-intestinal com a carcinogénese gástrica. Adicionalmente, pretende explorar o potencial da β -glicuronidase e do ácido desoxicólico como biomarcadores para a estratificação de risco e deteção precoce do cancro gástrico.

Palavras-Chave

Neoplasias Gástricas; Microbioma Gastrointestinal; beta-Glicuronidase; Ácido Desoxicólico; Biomarcadores

Abstract

Communication between microbial communities across the digestive tract is increasingly recognized as a key determinant of human health and disease. Growing evidence suggests that microbial crosstalk along the oral-gastric-gut axis may contribute to gastric carcinogenesis, not only through shifts in microbial composition but also through alterations in microbial metabolic activity. Among microbial-derived factors involved in carcinogenic processes, β -glucuronidase and deoxycholic acid, a major secondary bile acid, stand out as key candidates.

This study aims to investigate microbial β -glucuronidase activity and circulating deoxycholic acid levels as functional biomarkers associated with gastric neoplasia and gastric precancerous lesions. To address this objective, biological samples were collected from individuals undergoing upper gastrointestinal endoscopy, and analytical protocols were established for the assessment of fecal β -glucuronidase activity and serum deoxycholic acid concentrations.

By focusing on functional microbial signatures, this work seeks to advance current understanding of the mechanisms linking oral-gastric-gut axis dysbiosis to gastric carcinogenesis. We hypothesize that alterations in microbial β -glucuronidase activity and deoxycholic acid levels reflect functional disturbances along the digestive tract and may contribute to the identification of novel biomarkers for gastric cancer risk stratification and early detection.

Keywords

Stomach Neoplasms; Gastrointestinal Microbiome; beta-Glucuronidase; Deoxycholic Acid; Biomarkers.

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ADC - Adenocarcinoma

BCA - ácido bicinconínico

DCA - ácido desoxicólico

ESD - Endoscopic Submucosal Dissection (Dissecção Endoscópica da Submucosa)

HGD - High-Grade Dysplasia (Displasia de Alto Grau)

HRP - horseradish peroxidase (peroxidase de rábano)

IARC - International Agency for Research on Cancer

IPO-Porto - Instituto Português de Oncologia do Porto

LGD - Low-Grade Dysplasia (Displasia de Baixo Grau)

TMB - tetrametilbenzidina

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	iii
Sumário	iv
Introdução.....	1
Objetivos	3
Metodologia	4
População	4
Amostra	4
Material e Métodos	6
Determinação da atividade da β -glicuronidase fecal.....	6
Quantificação sérica de ácido desoxicólico (DCA)	6
Análise estatística.....	7
Resultados.....	8
Comparação dos biomarcadores entre os diferentes estádios histopatológicos	8
Comparação entre os momentos pré-ESD e pós-ESD	9
Correlação entre β -glicuronidase e ácido desoxicólico com a progressão das lesões gástricas	9
Associação independente dos biomarcadores com características clínicas....	10
Discussão	10
Conclusões	15

Referências	16
Parecer do orientador	19
Anexos	20
Anexo A - Protocolo de determinação da atividade da β glicuronidase em amostras fecais por colorimetria	20
Anexo B - Protocolo de quantificação de ácido desoxicólico no soro por ELISA competitivo	21

Introdução

O cancro gástrico representa um importante problema de saúde pública, ocupando o quinto lugar entre os cancros mais frequentemente diagnosticados e entre as principais causas de mortalidade por cancro a nível mundial⁽¹⁾. Apesar da tendência decrescente de incidência, estima-se que com o crescimento demográfico mundial e envelhecimento da população, o impacto global desta doença aumente⁽²⁾. O prognóstico permanece desfavorável, uma vez que o diagnóstico ocorre frequentemente em estadios avançados, consequência da ausência de sintomas específicos nas fases iniciais, e da limitada implementação de programas de rastreio em certas de regiões^(3, 4).

O adenocarcinoma gástrico constitui cerca de 90-95% dos casos de cancro gástrico. O subtipo intestinal, o mais prevalente, desenvolve-se através de uma sequência bem estabelecida de alterações da mucosa gástrica, denominada cascata de Correa, que evolui progressivamente de gastrite crónica para atrofia, metaplasia intestinal, displasia e, eventualmente, carcinoma invasivo⁽⁵⁾.

A infeção crónica por *Helicobacter pylori*, classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como carcinogénio do Grupo 1, é considerada o principal fator etiológico do cancro gástrico⁽⁶⁾. Contudo, estima-se que mais de metade da população mundial esteja infetada por *Helicobacter pylori*⁽⁷⁾, em contraste com os 1,1 milhões de novos casos anuais de adenocarcinoma gástrico⁽⁸⁾, que representam 0,014% da população mundial. Apenas uma pequena proporção dos indivíduos infetados (estimada em cerca de 1-3% ao longo da vida) desenvolve cancro gástrico, o que sugere a influência de outros fatores na progressão das lesões gástricas^(9, 10).

Nos últimos anos, a microbiota gastrointestinal emergiu como um potencial modulador deste processo. Para além de *H. pylori*, alterações da microbiota oral, gástrica e intestinal estão associadas a lesões pré-neoplásicas e a neoplasia gástrica⁽¹¹⁻¹⁹⁾. Apesar da considerável heterogeneidade dos resultados taxonómicos entre estudos, observa-se de forma consistente o enriquecimento de microrganismos tipicamente orais em regiões mais distais do trato gastrointestinal^(14, 20). Este processo de colonização ectópica evidencia a complexa interação funcional dos diferentes ecossistemas microbianos ao longo do trato digestivo, conceptualizada como eixo oral gástrico intestinal, cuja relevância para a saúde e a doença tem sido cada vez mais reconhecida⁽²⁰⁻²²⁾. Entre os mecanismos potencialmente envolvidos na promoção e progressão neoplásica destacam-se a modulação da resposta imunitária, alterações epigenéticas e alterações do metabolismo microbiano^(16, 23, 24).

Tem-se reconhecido que as alterações funcionais da microbiota poderão ser mais relevantes do que as alterações da sua composição taxonómica^(25, 26), pela sua influência direta na homeostasia imunológica, metabolismo hormonal e circulação entero-hepática⁽²⁶⁾.

Entre os mecanismos mais relevantes no âmbito deste trabalho destacam-se a atividade da β -glicuronidase e o metabolismo dos ácidos biliares secundários.

A β -glicuronidase bacteriana promove a desconjugação de compostos glicuronidados, influenciando a recirculação de hormonas, ácidos biliares e outros metabolitos biologicamente ativos^(27, 28). O aumento da sua atividade tem sido associado a alterações do metabolismo estrogénico⁽²⁹⁾ e a uma maior exposição a compostos potencialmente pró-inflamatórios e carcinogénicos^(27, 30).

Por sua vez, o ácido desoxicólico (DCA), resultante da transformação microbiana de ácidos biliares primários, tem sido associado a inflamação crónica, stress oxidativo, dano no ADN e ativação de vias envolvidas na carcinogénese gastrointestinal^(31, 32). No estômago, a exposição prolongada a ácidos biliares tem sido relacionada com gastrite química, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico^(33, 34).

Apesar da crescente evidência que relaciona a disbiose intestinal e o metabolismo microbiano com a carcinogénese gastrointestinal, a relevância da atividade da β -glicuronidase e do DCA na progressão das lesões gástricas permanece insuficientemente esclarecida. O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto IMAGE, um estudo prospetivo conduzido no IPO do Porto, e tem como objetivo avaliar a atividade fecal da β -glicuronidase e as concentrações séricas de DCA em indivíduos com diferentes estádios de lesão gástrica, explorando a sua associação com a progressão histopatológica da doença e o seu potencial como biomarcadores não invasivos da carcinogénese gástrica.

Objetivos

- Avaliar a atividade fecal de β -glicuronidase e os níveis séricos de ácido desoxicólico em indivíduos submetidos a endoscopia digestiva alta;
- Testar a associação destes biomarcadores com histologia gástrica e/ou presença de adenocarcinoma gástrico;
- Discutir se estes marcadores podem representar um elo biológico mensurável entre disbiose do eixo oral-gástrico-intestinal e carcinogénese gástrica.

Metodologia

População

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto IMAGE, um estudo prospetivo conduzido no IPO do Porto, com o objetivo de promover a deteção precoce e otimizar a abordagem clínica do cancro gástrico através da integração de dados clínicos, endoscópicos, anatomopatológicos e biológicos de indivíduos com lesões gástricas.

Foram incluídos doentes submetidos a Dissecção Endoscópica da Submucosa (ESD) entre outubro de 2021 e fevereiro de 2025, com diagnóstico histológico de displasia gástrica de baixo grau (LGD), displasia gástrica de alto grau (HGD) ou adenocarcinoma gástrico precoce (ADC). Após obtenção de consentimento informado, foram recrutados 120 participantes.

Amostra

A amostra do presente trabalho corresponde a um subconjunto da coorte IMAGE, selecionado com base na disponibilidade de amostras biológicas emparelhadas recolhidas em momentos temporais distintos da evolução clínica. Dos 120 doentes incluídos na coorte, 56 dispõem de amostras de sangue e fezes, recolhidas antes e após a ESD.

As características demográficas e clínicas da amostra encontram-se resumidas na Tabela 1.

Características demográficas	
Número total de participantes	56
Idade, média (anos)	69
Sexo feminino, n	22
Diagnóstico histopatológico	
Displasia gástrica de baixo grau, n	9
Displasia gástrica de alto grau, n	24
Adenocarcinoma gástrico precoce, n	23
Infecção <i>Helicobacter pylori</i>	
Negativo, n	34
Positivo, n	10
Erradicado, n	12

Tabela 1 - Caracterização demográfica e clínica da amostra

Este desenho longitudinal permite comparar o perfil biológico de cada participante na presença e na ausência da lesão, reduzindo a variabilidade interindividual e proporcionando um modelo particularmente robusto para a identificação de alterações associadas ao processo neoplásico. Ao utilizar cada indivíduo como o seu próprio controlo, esta abordagem aumenta a sensibilidade para detetar alterações dinâmicas do microbioma relacionadas com a presença da lesão, bem como para explorar o seu potencial biomarcador para a deteção precoce do cancro gástrico.

As amostras biológicas foram recolhidas de acordo com protocolos padronizados estabelecidos no âmbito do projeto. As amostras de sangue foram obtidas durante os procedimentos clínicos programados, centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para separação do plasma e subsequentemente armazenadas a -80

°C. As amostras fecais foram autocolhidas pelos participantes nos três dias que antecederam o procedimento endoscópico, conservadas sob refrigeração até à sua entrega no IPO-Porto e, após homogeneização, armazenadas a -80 °C até à realização das análises.

Material e Métodos

Determinação da atividade da β -glicuronidase fecal

A atividade da β -glicuronidase em amostras fecais é determinada por um método colorimétrico adaptado de (Flores et al., 2012)⁽³⁵⁾ e (Patel et al., 2023)⁽³⁶⁾.

O método baseia-se na capacidade da β -glicuronidase presente nos extratos fecais de hidrolisar o substrato cromogénico 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide, originando 4-nitrofenol. A quantidade de 4-nitrofenol formada é proporcional à atividade da enzima e é determinada por espectrofotometria através da medição da absorvância. A atividade enzimática é posteriormente normalizada pela concentração de proteína total presente no extrato fecal, determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), e expressos como mmol de produto formado por hora e por miligrama de proteína. O procedimento laboratorial encontra-se descrito em Anexo A.

Quantificação sérica de ácido desoxicólico (DCA)

A concentração sérica de ácido desoxicólico (DCA) é determinada através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) competitivo, de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial. O DCA presente na amostra compete com um conjugado de DCA ligado à peroxidase de rábano (HRP) pela ligação aos anticorpos

específicos anti-DCA imobilizados na microplaca. Assim, a intensidade da cor desenvolvida é inversamente proporcional à concentração de DCA presente na amostra. Após adição do substrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB), desenvolve-se uma coloração azul, interrompida pela adição da solução de paragem, que resulta numa coloração amarela. A concentração de DCA nas amostras é calculada por interpolação numa curva de calibração construída a partir das soluções padrão e expressa em $\mu\text{mol/L}$. O procedimento laboratorial encontra-se descrito no Anexo B.

Análise estatística

A análise estatística será realizada utilizando o software IBM SPSS Statistics, considerando-se um nível de significância estatística de $p < 0,05$.

As variáveis contínuas serão avaliadas quanto à normalidade da distribuição através do teste de Shapiro-Wilk e da observação de histogramas.

As diferenças na atividade da β -glicuronidase e nas concentrações séricas de ácido desoxicólico entre os grupos histopatológicos (LGD, HGD e ADC) serão avaliadas através de análise de variância de um fator (ANOVA) ou, se não se verificar normalidade da distribuição, pelo teste de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, será estudada a existência de uma tendência progressiva destes biomarcadores ao longo dos diferentes estádios de lesão gástrica.

As comparações entre os momentos pré-ESD e pós-ESD serão efetuadas através do teste t de Student para amostras emparelhadas ou, se não se verificar normalidade da distribuição dos dados, através do teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas.

As correlações entre a atividade fecal da β -glicuronidase e as concentrações séricas de ácido desoxicólico serão avaliadas através dos coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman, conforme apropriado.

As associações entre biomarcadores e variáveis clínicas serão exploradas através de análises de modelos de regressão multivariável ajustados para potenciais fatores de confusão, incluindo idade, sexo e estado de infecção por *H. pylori*.

Resultados

Comparação dos biomarcadores entre os diferentes estádios histopatológicos

Como hipótese principal, espera-se que a atividade fecal da β -glicuronidase e as concentrações séricas de ácido desoxicólico (DCA) apresentem um aumento progressivo entre os grupos com displasia de baixo grau (LGD), displasia de alto grau (HGD) e adenocarcinoma gástrico (ADC), refletindo alterações do metabolismo microbiano intestinal e da circulação entero-hepática dos ácidos biliares ao longo da progressão neoplásica.

Alternativamente, diferenças significativas poderão observar-se apenas nos estádios mais avançados, particularmente no grupo ADC, indicando que estas alterações metabólicas se tornam mais evidentes durante a progressão tumoral.

Por outro lado, a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos poderá indicar que a atividade da β -glicuronidase e os níveis séricos de DCA apresentam limitada capacidade discriminativa. Este resultado poderia também refletir a elevada heterogeneidade interindividual da microbiota intestinal, a influência de fatores externos não controlados, ou a complexidade multifatorial da carcinogénese gástrica.

Comparação entre os momentos pré-ESD e pós-ESD

A análise emparelhada entre os momentos pré e pós-ESD permitirá avaliar o impacto da remoção da lesão gástrica sobre os biomarcadores estudados. Uma diminuição significativa da atividade da β -glicuronidase fecal e/ou das concentrações séricas de DCA após a ESD sugeriria que a presença da lesão contribui para alterações sistêmicas ou intestinais detetáveis nestes parâmetros.

Por outro lado, a ausência de alterações significativas poderá indicar que estes biomarcadores refletem características mais estáveis do hospedeiro ou da microbiota intestinal, relativamente independentes da presença da lesão.

Alterações observadas apenas em indivíduos com HGD ou ADC sugeririam que a influência da lesão sobre estes biomarcadores depende da extensão das alterações neoplásicas e se torna mais evidente em fases avançadas da doença.

Correlação entre β -glicuronidase e ácido desoxicólico com a progressão das lesões gástricas

A análise de correlação permitirá explorar potenciais relações entre os biomarcadores estudados com a gravidade das lesões gástricas. Uma correlação positiva entre a atividade fecal da β -glicuronidase e os níveis séricos de DCA apoiaria a hipótese de envolvimento de vias biológicas comuns relacionadas com o metabolismo microbiano e a produção de metabolitos com potencial pró-inflamatório ou carcinogénico. Em contrapartida, correlações fracas ou inexistentes poderão indicar que estes biomarcadores refletem processos biológicos distintos ou que a sua interação é modulada por múltiplos fatores não

avaliados no presente estudo, incluindo composição microbiana, hábitos alimentares ou características metabólicas do hospedeiro.

É possível que as associações entre os biomarcadores sejam observadas apenas em determinados grupos histopatológicos. A presença de correlações mais fortes em HGD ou ADC sugeriria que a interação entre metabolismo microbiano e carcinogénese se torna progressivamente mais relevante ao longo da evolução da doença.

Associação independente dos biomarcadores com características clínicas

Os modelos de regressão multivariável permitirão avaliar se as associações observadas permanecem significativas após ajuste para potenciais fatores de confusão, incluindo idade, sexo e estado de infeção por *Helicobacter pylori*. Caso os biomarcadores mantenham uma associação independente com o estadio histopatológico, tal reforçará a hipótese de que refletem alterações biológicas relacionadas com a progressão das lesões gástricas. Por outro lado, a perda de significância após o ajuste sugerirá uma influência importante de fatores clínicos ou demográficos. Associações mais fortes com variáveis como idade, sexo ou infeção por *H. pylori* poderão indicar que estes biomarcadores refletem sobretudo características do hospedeiro ou do contexto microbiano subjacente.

Discussão

Os programas de rastreio desempenham um papel fundamental na deteção precoce do cancro gástrico, contribuindo para a melhoria do prognóstico e para a redução da mortalidade associada à doença⁽³⁷⁾. Atualmente, a endoscopia e os

testes de detecção de *Helicobacter pylori* são as principais abordagens utilizadas para este fim⁽³⁸⁾. No entanto, a implementação generalizada destas estratégias é frequentemente limitada pelos custos e pela disponibilidade de recursos, condicionando a adesão da população e o acesso aos cuidados de saúde⁽³⁷⁾. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos de rastreio acessíveis, sensíveis e custo-efetivos permanece uma prioridade⁽³⁷⁾.

Neste enquadramento, uma das principais contribuições conceptuais deste trabalho consiste na adoção de uma perspetiva funcional do microbioma, em detrimento de uma abordagem exclusivamente taxonómica⁽²⁶⁾. A literatura dedicada à caracterização das microbiotas oral, gástrica e intestinal em indivíduos com cancro gástrico tem produzido resultados frequentemente heterogéneos, refletindo diferenças entre populações estudadas, metodologias de amostragem, estratégias de sequenciação e abordagens analíticas⁽¹¹⁻¹⁹⁾. Em contraste, alterações funcionais do microbioma poderão representar mecanismos mais consistentes associados à carcinogénese gástrica.

A evidência crescente de interações entre microbiotas de diferentes segmentos do trato digestivo sugere que alterações funcionais associadas à carcinogénese gástrica poderão resultar de disrupções funcionais ao longo do eixo oral-gástrico-intestinal⁽³⁹⁾. A progressão das lesões gástricas é acompanhada por uma reorganização das redes de correlação microbiana, caracterizada pelo aumento de coocorrências de géneros tipicamente orais, e pela sua coexclusão com *Helicobacter pylori* ao longo da progressão histológica das lesões^(14, 16, 20). Este fenómeno sugere uma substituição gradual de comunidades dominadas por *H. pylori* por populações microbianas ecologicamente competitivas^(14, 20).

A colonização ectópica poderá ser favorecida por alterações da barreira gástrica, refluxo gastroesofágico, alterações da motilidade gastrointestinal, utilização de inibidores da bomba de prótons e de antibióticos^(22, 40). O aumento da abundância de microrganismos orais no estômago poderá remodelar o microambiente gástrico através da produção de compostos biologicamente ativos, incluindo lactato, lipopolissacarídeos, acetaldeído, sulfureto de hidrogénio e compostos N-nitrosos⁽²⁰⁾. Entre os mecanismos propostos para explicar a sua participação na carcinogénese gástrica incluem-se a modulação da resposta imunitária, a indução de alterações epigenéticas e a reprogramação do metabolismo microbiano e celular^(16, 23, 24).

Neste contexto, a avaliação de biomarcadores funcionais, como a atividade da β -glicuronidase e os níveis de ácido desoxicólico (DCA), poderá fornecer informação mais diretamente relacionada com a atividade biológica do ecossistema microbiano do que a simples caracterização da sua composição taxonómica. Ao refletirem processos metabólicos potencialmente partilhados por diferentes perfis microbianos, estes biomarcadores constituem uma abordagem promissora para explorar mecanismos associados à carcinogénese gástrica e identificar alterações funcionais com potencial utilidade clínica.

A atividade fecal da β -glicuronidase reflete capacidade enzimática do microbioma intestinal para desconjugar compostos glicuronizados e, assim, modular a disponibilidade de metabolitos biologicamente ativos^(27, 28). Embora exista ainda escassa investigação humana desta enzima no contexto específico do cancro gástrico, há evidência robusta de que β -glicuronidases bacterianas humanas conseguem reativar glicuronídeos estrogénicos, demonstrando a sua capacidade de aumentar a exposição do hospedeiro a moléculas previamente conjugadas e

destinadas à excreção^(29, 41). Em modelos experimentais, a inibição seletiva da β -glicuronidase bacteriana reduziu a disbiose induzida por carcinógenos e a tumorigenese intestinal⁽⁴²⁾. Em humanos, a atividade fecal desta enzima já foi descrita como aumentada em doentes com cancro colorretal⁽⁴³⁾. Em conjunto, estes dados sustentam a plausibilidade de que a sua atividade possa funcionar como marcador funcional de um microbioma com maior potencial pró-inflamatório, pró-proliferativo ou de recirculação de metabolitos carcinogénicos. Por sua vez, o ácido desoxicólico sérico constitui um marcador indireto do metabolismo microbiano dos ácidos biliares e da circulação entero-hepática. Estudos clínicos demonstraram associações entre concentrações elevadas de ácidos biliares, maior gravidade de atrofia e metaplasia intestinal e maior risco subsequente de cancro gástrico^(32, 44). Paralelamente, modelos experimentais mostraram que o DCA pode induzir metaplasia intestinal gástrica através de vias como TGR5/STAT3/KLF5, bem como ativar programas oncogénicos em células gástricas^(45, 46). Assim, a escolha do DCA como biomarcador é suportada por evidência que relaciona refluxo biliar, metabolismo microbiano e transformação epitelial gástrica.

Do ponto de vista metodológico, uma das principais forças deste trabalho reside no desenho longitudinal com recolha de amostras antes e após a dissecação endoscópica da submucosa. A utilização de amostras emparelhadas reduz a variabilidade interindividual e permite distinguir biomarcadores associados diretamente à presença da lesão de alterações biológicas persistentes potencialmente envolvidas na predisposição para o desenvolvimento tumoral. Esta hipótese é consistente com a evidência de que alterações da microbiota gástrica

podem persistir após a erradicação de *H. pylori* e de que o risco de neoplasia metacrónica permanece aumentado após o tratamento endoscópico de lesões gástricas precoces⁽⁴⁷⁾.

Limitações e Considerações futuras

O presente estudo apresenta algumas limitações que deverão ser consideradas na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, a atividade da β -glicuronidase e as concentrações séricas de ácido desoxicólico foram avaliadas em amostras fecais e de sangue que, embora constituam matrizes biológicas de recolha pouco invasiva e clinicamente relevantes, podem não refletir diretamente os fenómenos biológicos que ocorrem ao nível da mucosa gástrica e do microambiente tumoral. Além disso, diversos fatores com potencial influência sobre a microbiota intestinal e o metabolismo dos ácidos biliares, incluindo medicação, hábitos alimentares e comorbilidades, não foram sistematicamente controlados, podendo atuar como fatores de confusão. Apesar da natureza longitudinal do estudo e da utilização de amostras emparelhadas, não é possível excluir completamente a influência de alterações induzidas pelo procedimento terapêutico ou por modificações subsequentes nos hábitos e terapêuticas dos participantes.

A dimensão amostral relativamente reduzida, particularmente no grupo de displasia de baixo grau, poderá limitar o poder estatístico para detetar diferenças subtis entre os diferentes estádios histológicos. Adicionalmente, a heterogeneidade biológica inerente à carcinogénese gástrica poderá contribuir para a variabilidade observada entre participantes. Por fim, por se tratar de um estudo observacional realizado num único centro, os resultados não permitem

estabelecer relações de causalidade nem podem ser diretamente generalizados para outras populações sem validação externa.

Em termos de desenvolvimento futuro, será importante validar estes biomarcadores em coortes maiores, idealmente multicêntricas, e integrá-los com dados taxonômicos e funcionais do microbioma, estado de *H. pylori* e outras variáveis clínicas relevantes. A avaliação da sua capacidade preditiva para recorrência, lesões metacrônicas ou progressão histológica poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de estratificação de risco e detecção precoce do cancro gástrico.

Conclusões

Em síntese, o presente trabalho sustenta a pertinência biológica de estudar a atividade fecal da β -glicuronidase e as concentrações séricas de ácido desoxicólico como marcadores funcionais do eixo oral-gástrico-intestinal na carcinogénese gástrica. A literatura disponível mostra que o cancro gástrico se associa a disbiose oral, gástrica e intestinal, alterações funcionais do microbioma e alterações do metabolismo dos ácidos biliares. Demonstra igualmente que a β -glicuronidase bacteriana e o DCA têm potencial para modular inflamação, recirculação de metabolitos e programas celulares associados à transformação neoplásica. Neste enquadramento, a análise destes dois biomarcadores em amostras não invasivas constitui uma abordagem inovadora, mecanisticamente fundamentada e clinicamente promissora.

Referências

1. Stomach Cancer Fact Sheet. GLOBOCAN 2020. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer; 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/7-stomach-fact-sheet.pdf>.
2. Thrift AP, Wenker TN, El-Serag HB. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023; 20(5):338-49.
3. Oba K, Paoletti X, Bang YJ, Bleiberg H, Burzykowski T, Fuse N, et al. Role of chemotherapy for advanced/recurrent gastric cancer: An individual-patient-data meta-analysis. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*. 2013; 49(7):1565-77.
4. Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, Chao J, Cooke D, Corvera C, et al. Gastric Cancer, Version 2.2022. *JOURNAL OF THE NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK*. 2022; 20(2):167-92.
5. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992; 52(24):6735-40.
6. IARC A. Review of Human Carcinogens. Part F Chemical Agents and Related Occupations. 2012; 100(Pt B):1-441.
7. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017; 153(2):420-29.
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71(3):209-49.
9. Amieva M, Peek RM. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *GASTROENTEROLOGY*. 2016; 150(1):64-78.
10. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *NATURE REVIEWS CANCER*. 2010; 10(6):403-14.
11. Zhang R, Wu Y, Ju W, Wang S, Liu Y, Zhu H. Gut microbiome alterations during gastric cancer: evidence assessment of case-control studies. *Front Microbiol*. 2024; 15:1406526.
12. Yang Y, Ji R, Zhao X, Cao X, Wang Q, Jiang Q, et al. Alterations in Gastric Mucosal Microbiota in Gastric Carcinogenesis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8:754959.
13. Wang Y, Wang Y, Han W, Han M, Liu X, Dai J, et al. Intratumoral and fecal microbiota reveals microbial markers associated with gastric carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024; 14:1397466.
14. Li Y, Hu Y, Zhan X, Song Y, Xu M, Wang S, et al. Meta-analysis reveals *Helicobacter pylori* mutual exclusivity and reproducible gastric microbiome alterations during gastric carcinoma progression. *Gut Microbes*. 2023; 15(1):2197835.
15. Liu CA, Ng SK, Ding YQ, Lin YF, Liu WX, Wong SH, et al. Meta-analysis of mucosal microbiota reveals universal microbial signatures and dysbiosis in gastric carcinogenesis. *ONCOGENE*. 2022; 41(28):3599-610.
16. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2018; 67(2):226-36.

17. Reitano E, de'Angelis N, Gavriilidis P, Gaiani F, Memeo R, Inchingolo R, et al. Oral Bacterial Microbiota in Digestive Cancer Patients: A Systematic Review. *Microorganisms*. 2021; 9(12)
18. Huang K, Gao X, Wu L, Yan B, Wang Z, Zhang X, et al. Salivary Microbiota for Gastric Cancer Prediction: An Exploratory Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:640309.
19. Chen Y, Lei L, Xia M, Cheng R, Cai H, Hu T. The association between oral microbiome and gastric precancerous lesions. *mSystems*. 2025; 10(1):e0132224.
20. Xia M, Lei L, Zhao L, Xu W, Zhang H, Li M, et al. The dynamic oral-gastric microbial axis connects oral and gastric health: current evidence and disputes. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2025; 11(1):1.
21. Kunath BJ, De Rudder C, Laczny CC, Letellier E, Wilmes P. The oral-gut microbiome axis in health and disease. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*. 2024; 22(12):791-805.
22. Rajasekaran JJ, Krishnamurthy HK, Bosco J, Jayaraman V, Krishna K, Wang T, et al. Oral Microbiome: A Review of Its Impact on Oral and Systemic Health. *Microorganisms*. 2024; 12(9)
23. Coker OO, Dai Z, Nie Y, Zhao G, Cao L, Nakatsu G, et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut*. 2018; 67(6):1024-32.
24. Park SY, Hwang BO, Lim M, Ok SH, Lee SK, Chun KS, et al. Oral-Gut Microbiome Axis in Gastrointestinal Disease and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(9)
25. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 2017; 550(7674):61-66.
26. Proctor LM, Creasy HH, Fittweis JM, Lloyd-Price J, Mahurkar A, Zhou W, et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019; 569(7758):641-48.
27. Koppel N, Rekdal VM, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *SCIENCE*. 2017; 356(6344)
28. Dashnyam P, Mudududdla R, Hsieh T-J, Lin T-C, Lin H-Y, Chen P-Y, et al. B-Glucuronidases of opportunistic bacteria are the major contributors to xenobiotic-induced toxicity in the gut. *Scientific Reports*. 2018; 8(1):16372.
29. Flores R, Shi J, Fuhrman B, Xu X, Veenstra TD, Gail MH, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *J Transl Med*. 2012; 10:253.
30. Plottel Claudia S, Blaser Martin J. Microbiome and Malignancy. *Cell Host & Microbe*. 2011; 10(4):324-35.
31. Joo S, Fang S. Bile Acids and Gastric Intestinal Metaplasia: Exploring a New Feedback Loop. *Gut Liver*. 2024; 18(3):365-67.
32. Jia W, Xie GX, Jia WP. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *NATURE REVIEWS GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY*. 2018; 15(2):111-28.
33. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH*. 2005; 589(1):47-65.
34. Dixon MF, Mapstone NP, Neville PM, Moayyedi P, Axon ATR. Bile reflux gastritis and intestinal metaplasia at the cardia. *GUT*. 2002; 51(3):351-55.

35. Flores R, Shi J, Gail MH, Ravel J, Goedert JJ. Assessment of the human faecal microbiota: I. Measurement and reproducibility of selected enzymatic activities. *Eur J Clin Invest.* 2012; 42(8):848-54.
36. Patel J, Chaudhary H, Rajput K, Parekh B, Joshi R. Assessment of gut microbial β -glucuronidase and β -glucosidase activity in women with polycystic ovary syndrome. *Scientific Reports.* 2023; 13(1):11967.
37. Committee EG, Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, Fleitas T, Haustermans K, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2022; 33(10):1005-20.
38. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer:: an open-label, randomised controlled trial. *LANCET.* 2008; 372(9636):392-97.
39. Schmidt TS, Hayward MR, Coelho LP, Li SS, Costea PI, Voigt AY, et al. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife.* 2019; 8
40. Xiao X, Zhang X, Wang J, Liu Y, Yan H, Xing X, et al. Proton pump inhibitors alter gut microbiota by promoting oral microbiota translocation: a prospective interventional study. *Gut.* 2024; 73(7):1098-109.
41. Ervin SM, Li H, Lim L, Roberts LR, Liang X, Mani S, et al. Gut microbial β -glucuronidases reactivate estrogens as components of the estrobolome that reactivate estrogens. *Journal of Biological Chemistry.* 2019; 294(49):18586-99.
42. Takada H, Hirooka T, Hiramatsu Y, Yamamoto M. Effect of beta-glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 1982; 42(1):331-34.
43. Kim DH, Jin YH. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res.* 2001; 24(6):564-7.
44. Rezen T, Rozman D, Kovács T, Kovács P, Sipos A, Bai P, et al. The role of bile acids in carcinogenesis. *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES.* 2022; 79(5)
45. Jin DC, Huang KT, Xu M, Hua HJ, Ye F, Yan J, et al. Deoxycholic acid induces gastric intestinal metaplasia by activating STAT3 signaling and disturbing gastric bile acids metabolism and microbiota. *GUT MICROBES.* 2022; 14(1)
46. Xu YJ, Watanabe T, Okazaki H, Tanigawa T, Watanabe K, Tominaga K, et al. Bile Acids Induce Expression of CDx2 and MUC2 in Normal Rat Gastric Epithelial Cells via Activation of Nuclear Receptor FXR - a Possible Mechanism of Intestinal Metaplasia in the Stomach. *GASTROENTEROLOGY.* 2009; 136(5):A616-A16.
47. Sung JJY, Coker OO, Chu E, Szeto CH, Luk STY, Lau HCH, et al. Gastric microbes associated with gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia 1 year after *Helicobacter pylori* eradication. *GUT.* 2020; 69(9):1572-80.

Parecer do orientador

PARECER

A estudante Catarina Lopes Ferreira, durante o seu período de estágio académico no qual desenvolveu, sobretudo, atividades de investigação relacionadas com o microbiota intestinal num contexto das Ciências da Nutrição.

A estudante revelou desde logo iniciativa e muita curiosidade científica, assim como autonomia. Mais, os objetivos traçados foram parcialmente atingidos na medida em que a temática era demasiado ambiciosa para o escasso tempo a dedicar. Quando a opção é um trabalho de investigação, este vai sendo desenvolvido no âmbito das atividades do seu estágio, em paralelo com a revisão do estado da literatura científica, acabando por ter permitido a participação na escrita de artigo científico de revisão sobre o tema.

A estudante cumpre horário no local de estágio, desenvolvendo atividades diversas, onde a aprendizagem foi muito completa. A estudante fez apresentações científicas, escreveu artigo de opinião, participou na escrita de artigo científico, participou na implementação de estudo clínico, desenhou um protocolo de investigação no âmbito do seu trabalho complementar, entre todas as outras solicitações e desafios que foi tendo, sempre de forma muito discreta mas eficiente. Por isto, se percebe o enorme esforço na leitura de uma vasta bibliografia que se pode encontrar nas áreas, o tempo de escolha dos artigos e a sistematização de uma informação, muitas vezes não sistematizável.

Para um estudante de pré-graduação, neste contexto, considero que a Catarina evolui imenso, e que os objetivos pedagógicos que devemos considerar nesta fase de formação foram atingidos.

A temática é inegavelmente de interesse quer científico, quer clínico, em particular dos nutricionistas, pelo que a escolha, da responsabilidade da candidata ao grau de licenciada, levou-nos a concluir que temos um caminho a percorrer sobretudo no que diz respeito aos estudos clínicos, de intervenção com dietas e/ou probióticos que ainda estão por realizar.

A orientadora,



Conceição Calhau

(Professora Catedrática, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa)

Lisboa, 02 de julho de 2026

Anexos

Anexo A - Protocolo de determinação da atividade da β glicuronidase em amostras fecais por colorimetria

Extração proteica das amostras fecais

1. Pesar aproximadamente 0,5 g de fezes descongeladas em 5 ml de PBS.
2. Transferir a amostra para um tubo cônico de 10 mL contendo 5 mL de tampão de extração. Manter a amostra em gelo durante todo o procedimento.
3. Homogeneizar vigorosamente no vórtex durante 1 minuto.
4. Sonicar durante 90 segundos, em ciclos de 30 segundos, mantendo o tubo em banho de gelo.
5. Centrifugar a 22 000 g, durante 30 minutos, a 4 °C.
6. Transferir cuidadosamente o sobrenadante, para tubos limpos.
7. Determinar a concentração de proteína total pelo método BCA, de acordo com as instruções do fabricante.

Ensaio da atividade da β -glucuronidase

8. Transferir 0,25ml do sobrenadante para tubos eppendorf.
9. Pré-aquecer o substrato 2 mM 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide, pH 7,0, a 37 °C.
10. Iniciar a reação adicionando 0,25ml de 2 mM 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide.
11. Incubar a 37°C durante 15 min.

12. Adicionar 500 µl de buffer de glicina.
13. Monitorizar a formação de 4-nitrofenol por leitura da absorvância a 540 nm.
14. Registar a cinética da reação durante 60 minutos para extratos com concentração proteica suficiente. Para amostras muito diluídas, a leitura pode ser prolongada até 5 horas.

A atividade enzimática é calculada com base numa curva de calibração obtida utilizando β -glicuronidase padrão e expressa como mmol de produto formado por hora e por miligrama de proteína ($\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), após normalização pela concentração de proteína total determinada pelo método BCA.

Anexo B - Protocolo de quantificação de ácido desoxicólico no soro por ELISA competitivo

Preparação dos reagentes

1. Antes de iniciar, deixar todos os reagentes atingir a temperatura ambiente.
2. Preparar a solução de lavagem de acordo com as instruções do fabricante.
3. Preparar os padrões de DCA através de diluições seriadas, conforme o intervalo de deteção indicado no kit.
4. Diluir as amostras de soro, se necessário, de acordo com a ficha técnica do kit.

Procedimento

1. Adicionar aos poços os padrões, controlos e amostras de soro.
2. Adicionar o tampão de ensaio e o conjugado do DCA.
3. Incubar a placa durante 1 hora a 37 °C.

4. Após incubação, remover o conteúdo dos poços.
5. Lavar a placa várias vezes com solução de lavagem.
6. Adicionar o substrato TMB a cada poço.
7. Incubar protegido da luz até desenvolvimento da cor azul.
8. Adicionar a solução de paragem, que transforma a cor azul em amarela.
9. Ler a absorbância a 450 nm.

