

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROCESSOS SELETIVOS PARA MESTRADO E DOUTORADO 2025

Prova de Escrita de Conhecimentos - Valor 100,00

Atenção: Respeitar o limite de espaço para responder a cada questão, conforme especificação.

Povas com identificação do candidato serão desclassificadas.

Com base no Artigo intitulado “*A high-fat diet promotes cancer progression by inducing gut microbiota–mediated leucine production and PMN-MDSC differentiation*” de Chen e Colaboradores” DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2306776121> responda às questões seguintes:

1. Na figura 1 A-E, os autores mostram que pacientes com índice de massa corporal (IMC) maior que 24 têm menor taxa de sobrevivência e desfechos mais negativos no câncer de mama comparado com pacientes com IMC menor que 24. Além disso, pacientes com IMC maior que 24 têm alterações na microbiota intestinal positivamente correlacionadas com aumento de indicadores de taxa de crescimento tumoral.

a) Os modelos abordados na Figura 1 e Figura Suplementar 1 mostram que as alterações da microbiota intestinal induzidas por dieta hiperlipídica (*high-fat diet*, HFD) aumentam o crescimento do tumor de modo **dependente ou independentemente** do aumento de peso corporal dos animais? Aponte e justifique os experimentos e achados que suportam esta conclusão. O modelo com animais *germ-free* colonizados com bactéria (Figura 5) corrobora esta conclusão? Justifique.

O crescimento do tumor é **independente** do aumento da massa corporal dos animais (2pts). Em primeiro lugar, no modelo de transplante de microbiota fecal (Figura 1F), os animais que receberam a microbiota HFD, constituiu o grupo HDFMT, que não teve aumento de massa corporal comparado aos animais normal-fat diet (NFD), mas apresentou maior tamanho de tumor comparado com NFD (Figura 1H). Em segundo lugar, o tratamento com antibiótico dos animais HDF (Figura 1I) e HDFMT (Figura 1L) não afetou a massa corporal de nenhum dos dois grupos, mas diminuiu o tamanho do tumor em ambos os grupos, Figuras 1K e 1N, respectivamente (6pts). Sim, o modelo com animais *germ-free* colonizados com bactéria corrobora esta conclusão. A gavagem com *D. desulfuricans* acelerou o crescimento do tumor sem afetar a massa corporal dos camundongos (2pts).

b) Os animais alimentados com HFD ou que foram submetidos ao transplante de microbiota fecal de camundongos HFD (grupo HDFMT) tiveram maiores concentrações fecais, séricas e medulares de leucina comparado ao grupo controle. O efeito da leucina sobre o aumento do tamanho do tumor é **dependente ou independente** do aumento de massa corporal dos animais? Aponte e justifique ao menos dois experimentos e achados que suportam esta conclusão.

O efeito da leucina sobre o aumento do tamanho do tumor é **independente** do aumento de massa corporal dos animais (4pts). A gavagem de leucina em animais com dieta controle (NFD+L) promoveu aumento significativo do tamanho do tumor comparado aos animais NFD sem tratamento com leucina (Figura 4H-J). A adição de leucina aumenta o tamanho do tumor de camundongos com peso corporal normal (*Lean case + Leucine*, Figura 7L). Além disso, camundongos obesos tratados com nimesulida, responsável por inibir o transporte de aminoácidos neutros, apresentam redução do tamanho do tumor (*Obesity case + Nimesulide*, Figura 7L) (6pts).

Não foram consideradas como respostas corretas a abordagem de experimentos que mostram que os animais HFD e HDFMT têm aumento de leucina nas fezes ou soro em paralelo ao aumento do tamanho do tumor, porque estes achados não estabelecem relação de efeito da leucina. Eles são limitados à conclusão de associação entre a concentração do aminoácido e a progressão do tumor.

2. A partir da Figura 6B, os autores mostram que os efeitos da leucina sobre a diferenciação de progenitores mielóides em células polimorfonucleares supressoras podem estar associados à ativação da via de mTOR. Os efeitos da leucina observados nas proteínas da via de mTOR nesta figura indicam alterações transcricionais, traducionais ou pós-traducionais? Em sua resposta, conceitue e diferencie os três níveis de regulação biológica mencionados.

Os achados da Figura 6B indicam **alterações pós-traducionais** da leucina sobre a via, uma vez que a presença do aminoácido aumenta o conteúdo de mTOR fosforilado, mas não o conteúdo total de mTOR. Não há medida de mRNA de mTOR (3pts).

A regulação transcricional envolve o acesso da maquinaria transcricional, incluindo fatores de transcrição e a RNA polimerase, às regiões promotoras dos genes, modulando assim o início e a eficiência da transcrição, o que culmina na produção dos RNA mensageiro (mRNA). 4 pts

A regulação traducional corresponde ao controle do processo de tradução, no qual o mRNA é decodificado pelos ribossomos com a participação dos RNA transportadores (tRNAs), responsáveis por reconhecer os códons do mRNA por meio de seus anticódons e entregar os aminoácidos correspondentes para a síntese proteica. Nesse nível, a eficiência da tradução pode ser modulada pela célula, com aumento, redução ou bloqueio da produção de proteínas. Trata-se de um mecanismo fundamental para ajustes rápidos da expressão gênica em resposta às demandas celulares. 4 pts

A regulação pós-traducional ocorre após a síntese da proteína, dependendo da proteína e do tipo de modificação envolvida. Esse nível regulatório inclui processos como fosforilação, acetilação, ubiquitinação e clivagem proteolítica, além de alterações na estabilidade, na conformação e no endereçamento subcelular da proteína. Dessa forma, a proteína pode ser ativada, inativada, degradada ou redirecionada para diferentes compartimentos celulares. 4 pts

03. A associação entre obesidade/sobrepeso e pior prognóstico em diferentes tipos de câncer é amplamente descrita na literatura científica. Entretanto, estudos observacionais apresentam limitações importantes para a inferência de causalidade, como a presença de fatores de confusão, correlações espúrias e diferenças estatisticamente significativas que podem não representar efeitos biologicamente relevantes.

A partir da análise do microbioma intestinal de mulheres com câncer de mama em eutrofia ou obesidade/sobrepeso (Figura 1D) e de camundongos fêmeas alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 2A-B), os autores observaram enriquecimento do gênero *Desulfovibrio* associado à obesidade em ambos os modelos (humano e animal). Em seguida, a partir de uma abordagem metabômica, os autores identificaram o enriquecimento do aminoácido de cadeia ramificada leucina nas fezes, sangue e medula óssea dos animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Estas abordagens globais (ômicas) fundamentam a hipótese de que a leucina derivada do metabolismo de bactérias do gênero *Desulfovibrio* suportam a diferenciação de células polimorfonucleares supressoras e o crescimento acelerado do tumor de mama. Como os autores confirmaram experimentalmente que a **mudança da microbiota** com elevada **produção de leucina** eram responsáveis (causalidade) por tal fenômeno?

Vários experimentos colaboraram para o estabelecimento de causalidade entre a microbiota e a elevada produção de leucina com o fenótipo observado de piora em relação ao crescimento do câncer de mama.

1. **Transferência de microbiota:** A relação de causalidade entre a mudança de microbiota e o desfecho de progressão tumoral acelerada pode ser estabelecida quando a transferência da microbiota associada à obesidade (ou à dieta high fat - HFD), que por si só, já foi suficiente e determinante para reproduzir tal desfecho. O transplante de fezes reproduz apenas a microbiota associada à obesidade induzida pela dieta HFD e os demais fenômenos desencadeados (*downstream*) por esta microbiota, sem os demais componentes da obesidade (ganho de peso, inflamação, etc.). Um destes fenômenos dependentes da microbiota, foi a diferenciação de precursores mielóides em células polimorfonucleares supressoras, que também foi observada nos animais em dieta *high fat* e nos animais que receberam o transplante da microbiota fecal de animais em dieta *high fat*.
2. **Tratamento com antibióticos:** O tratamento dos animais com antibióticos também permitiu o estabelecimento desta relação de causalidade. Ao impedir a mudança da microbiota

associada à obesidade, o tratamento com antibióticos (tanto em animais alimentados com dieta HFD quanto em animais que receberam transplante de microbiota) preveniu a diferenciação em células polimorfonucleares supressoras e a progressão tumoral acelerada, tanto nos camundongos em dieta *high fat* quanto nos camundongos que receberam microbiota fecal associada à esta dieta.

3. **Suplementação com leucina:** Abordagens semelhantes foram utilizadas para estabelecer a relação causal da leucina como metabólito responsável por estes fenômenos. Os autores suplementaram os animais com leucina, mostrando que o aumento de seus níveis era suficiente e determinante para os desfechos investigados (diferenciação em células polimorfonucleares supressoras e progressão tumoral acelerada).;
4. **Uso de inibidores:** O tratamento dos animais ou culturas de células com inibidores do transporte de aminoácidos, como o BCH e a nimesulida, que foram capazes de prevenir a diferenciação em células polimorfonucleares supressoras e a progressão tumoral acelerada. Nesse sentido, o uso do everolimus (inibidor de mTorC1) tanto in vitro quanto in vivo, também foi capaz de reverter o efeito pró-tumoral promovido pela leucina.

Estes foram os experimentos principais relacionados ao enunciado da questão, mas outras abordagens mencionadas também foram aceitas:

1. A colonização de animais germ free com *Desulfovibrio* também promoveu o fenótipo pró-tumor
2. Na análise de metaboloma, a via de biossíntese de BCAA estava aumentada em animais alimentados com a dieta high fat (em relação à dieta normal). Da mesma forma, na análise genômica das bactérias, a microbiota associada à dieta HFD possuía os genes relacionados às enzimas da biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada, e tais genes estavam incompletos nos microrganismos enriquecidos na dieta norma.

04. Considerando o artigo de Chen et al. (2024), marque V ou F e justifique as afirmativas falsas com base nos dados do artigo:

- a) (**F**) Índices de massa corporal maiores que 24 em humanos estão associados a piores prognósticos em câncer de mama quando o desfecho estudado é tempo de sobrevivência sem a doença, mas não têm efeito na sobrevivência geral da população estudada;
- b) (**V**) No estudo do microbioma de pacientes com câncer (humanos), houve diferenças importantes no microbioma na comparação de pessoas com IMC > 24 ou ≤ 24. O gênero *Desulfovibrio* apresentou correlação positiva significativa com a expressão de Ki67 e o tamanho do tumor.
- c) (**F**) Camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD) apresentaram importantes diferenças no microbioma em relação à camundongos alimentados com dieta normal, destacando-se um aumento relativo nos grupos *Bacteroidales_S24-7_group*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group* e *Alloprevotella*.
- d) (**V**) Camundongos alimentados com dietas ricas em gorduras ou animais que receberam transplante de fezes de animais alimentados com este tipo de dieta (grupos HFD e HDFMT) apresentaram um aumento significativo de células MDSC no tumor e na circulação. Especificamente, houve uma elevação marcante de PMN-MDSCs tanto no microambiente tumoral quanto no sangue.
- e) (**V**) Nos camundongos alimentados com dietas ricas em gordura ou animais que receberam transplante de fezes de animais alimentados com este tipo de dieta (grupos HFD e HDFMT) houve

um aumento de células precursoras GMP, mas não CMP da medula óssea e este aumento parece ter relação com a microbiota, uma vez que o uso de antibióticos diminuiu a expressão dos precursores GMP.

f) (F) Os resultados demonstram que a leucina é o único metabólito da microbiota aumentado nas fezes e no soro dos animais alimentados com dietas ricas em gordura

a) Os piores desfechos são observados tanto para tempo de sobrevivência sem a doença, quanto para sobrevivência geral.

c) Nos camundongos alimentados com dieta HFD houve aumento relativo dos outros gêneros citados na figura 2B: *Ruminiclostridium_9*; *Ruminiclostridium*; *bacterium_f_Ruminococcaceae*; *Desulfovibrio*; *Blautia*

f) Na figura 4A (metaboloma das fezes é possível notar aumento em L-leucina; L-norleucina; L-valina e L-isoleucina em animais HFD; Nas figura 4 B e C também é importante notar aumento significativo de leucina, isoleucina e valina no soro e fezes de animais HFD em relação à NFD (e no soro, este aumento também foi observado no grupo de transplante de fezes - HDFMT)

05. Os autores demonstram que as alterações da microbiota associadas à obesidade/sobrepeso em humanos e à dieta hiperlipídica em camundongos suportam a diferenciação de células polimorfonucleares supressoras e progressão acelerada do câncer de mama de modo dependente da via de mTOR. Considere os modelos experimentais abaixo.

A) Análise global do microbioma intestinal (amostra de fezes) de mulheres com câncer de mama e de modelo murino de câncer de mama e obesidade (HFD).

B) Tratamento dos animais em dieta hiperlipídica com antibiótico.

C) Depleção de células polimorfonucleares pela injeção de anticorpos anti-Gr1.

D) Análise global do metaboloma das fezes dos animais em dieta normolipídica ou hiperlipídica.

E) Transplante da microbiota fecal de camundongos em dieta hiperlipídica ou de humanas com câncer de mama, em obesidade ou eutrofia, para camundongos em dieta normolipídica.

F) Suplementação com leucina dos animais em dieta normolipídica .

G) Colonização de camundongos *germ free* com *Desulfovibrio desulfuricans*.

H) Tratamento dos animais em dieta hiperlipídica ou recipientes da microbiota fecal associada à esta dieta com a droga Everolimus.

I) Diferenciação de células progenitoras mielóides na presença de leucina ou do soro de animais em dieta hiperlipídica/transplante de microbiota fecal associada a esta dieta.

J) Tratamento de animais recipientes da microbiota de pacientes em obesidade ou eutrofia com a droga Nimesulida.

a) Qual(is) do(s) modelo(s) e abordagem(ns) experimental(is) melhor suporta(m) a relação de causa e consequência entre a ativação da via de mTOR, a diferenciação de células polimorfonucleares supressoras e a progressão acelerada do câncer de mama. Justifique sua resposta e descreva quais os controles experimentais necessários para estes experimentos.

Os modelos C e H

O modelo C mostra a relação causal entre células polimorfonucleares e progressão acelerada do câncer de mama. Animais em dieta hiperlipídica, ou recipientes da microbiota associada à esta dieta, normalmente teriam a progressão tumoral acelerada. No entanto, após depleção das células

polimorfonucleares pelo anticorpo anti-GR1, este fenótipo foi perdido, logo, estabelecendo a dependência destas células para o avanço do câncer.

O modelo H estabelece a dependência da via de mTOR para a diferenciação de células polimorfonucleares supressoras e, logo, para a aceleração da progressão do câncer. A inibição da via de mTOR pelo fármaco everolimus, impediu tanto a diferenciação de progenitores mielóides em células polimorfonucleares supressoras *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, quanto a progressão acelerada do câncer de mama *in vivo*.

Como controle experimental, foi administrado um anticorpo do mesmo isotipo, mostrando que o fenômeno observado dependia da especificidade do anticorpo contra a proteína Gr1, não sendo observado com qualquer anticorpo de mesma classe. Além disso, a eficiência da exclusão das células foi confirmada por citometria de Fluxo. Em relação ao tratamento com Everolimus, o PBS foi usado como veículo da droga.

Os modelos F e I não foram considerados, pois apesar de estabelecerem o papel relevante da leucina, não demonstram por si só que a leucina promove estas mudanças de modo dependente via de mTOR. Mesmo a leucina induzindo a ativação de mTOR *in vitro*, a relação causal não é estabelecida.

b) Qual(is) do(s) modelo(s) e abordagem(ns) experimental(is) acima melhor suporta(m) a relação de causa e consequência entre as alterações da microbiota e maior susceptibilidade ao câncer de mama. Justifique sua resposta.

Modelos B, E e G.

O tratamento com antibiótico (modelo B) mostra que perturbar o crescimento dos microorganismos característicos da microbiota em dieta hiperlipídica previne a aceleração do câncer de mama em camundongos com obesidade.

O transplante da microbiota fecal de camundongos em dieta hiperlipídica para camundongos em dieta normolipídica (modelo E) mostra que a microbiota associada à dieta *high fat* é suficiente para estabelecer a aceleração da progressão tumoral. O mesmo é observado quando animais *germ free* são colonizados com *Desulfovibrio desulfuricans*, mostrando que a alteração da microbiota é suficiente.

O modelo A não foi considerado como resposta correta, uma vez que apenas demonstrar a alteração da microbiota não é suficiente para determinar a relação causal entre esta alteração e os desfechos desfavoráveis (progressão tumoral, mortalidade) em mulheres com câncer de mama ou modelo murino de câncer de mama em dieta *high fat* (0,5 ponto).

c) Considere o experimento do modelo J: Os pesquisadores fizeram o transplante da microbiota fecal de mulheres com câncer de mama em obesidade ou eutrofia para camundongos. Os camundongos foram tratados ou não com a droga Nimesulida, descrita pelos autores como um inibidor do transporte de aminoácidos neutros. Apesar da inibição da absorção de aminoácidos ser um efeito colateral conhecido da nimesulida, a ação primária da nimesulida é de anti-inflamatório não-esteroidal inibidor de COX-2. Logo, tendo em vista a relação conhecida entre inflamação e progressão tumoral, o efeito da nimesulida no estudo pode não ter ocorrido devido a inibição do transporte do aminoácido leucina. Proponha pelo menos um experimento para confirmar que tal efeito se deve a inibição da absorção de aminoácidos, e não à ação da nimesulida como anti-inflamatório.

Foram consideradas as seguintes propostas de experimentos:

O uso de um inibidor mais específico para o transporte de aminoácidos, como o BCH utilizado nos experimentos *in vitro* no próprio artigo. Preferencialmente, seria utilizado um inibidor do transporte de aminoácidos de cadeia lateral ramificada, mais específico para leucina. Abordagens genéticas, como *knock out* (KO, deleção do gene) ou *Knock down* (KD, silenciamento do gene) para genes específicos de transportadores de aminoácidos também seriam viáveis.

O modelo de transplante da microbiota fecal de mulheres com câncer de mama em obesidade ou eutrofia para camundongos pode ser reproduzido em camundongos KO para COX-II. Se a nimesulida perder seu efeito nos camundongos KO para COX-II, significa que tal efeito se deve à sua ação anti-inflamatória. Se a nimesulida mantiver seu efeito nos camundongos KO para COX-II, seu efeito se deve à inibição do transporte de aminoácidos.

Outra possibilidade seria mostrar que outros fármacos anti-inflamatórios inibidores de COX (AAS, diclofenaco de sódio, diclofenaco de potássio, etc.) não apresentariam o mesmo efeito que a nimesulida, restando assim a atribuição de efeito à inibição do transporte de aminoácidos.

O tratamento com nimesulida em camundongos injetados com leucina pela via endovenosa ou intraperitoneal também poderia separar sua ação anti-inflamatória de sua ação na inibição da absorção de aminoácidos. Se a nimesulida não apresentar efeito neste modelo, exclui-se a possibilidade de efeito devido à sua ação anti-inflamatória.

Respostas propondo experimentos *in vitro* receberam notas parciais, uma vez que o modelo *in vitro* não seria capaz de diferenciar o impacto da ação anti-inflamatória da ação inibidora da absorção de aminoácidos nos camundongos. Além disso, a inibição do transporte de aminoácidos com um inibidor específico *in vitro* já foi realizada e apresentada no artigo.

06. Na discussão do artigo de Chen e colaboradores (2024), os autores reconhecem a limitação de usar um anticorpo contra a proteína Gr1, característica de células polimorfonucleares, presente em neutrófilos além das células polimorfonucleares supressoras de linhagem mielóide (PMN-MDSCs, o alvo da pesquisa). Nos dados de citometria de fluxo apresentados no artigo, as PMN-MDSCs foram caracterizadas como Gr1+, CD11b+, Ly6G+ Ly6C-, marcadores também compartilhados com neutrófilos.

a) Quais os dados apresentados no artigo para suportar a ideia de que estas células eram realmente células polimorfonucleares supressoras, e não neutrófilos ou outras células polimorfonucleares?

As PMN-MDSCs foram diferenciadas de neutrófilos por citometria de fluxo considerando, além dos marcadores descritos acima, a ausência do receptor de quimiocina CXCR2. Este receptor reconhece quimiocinas responsáveis pela migração de neutrófilos, estando ausente nas PMN-MDSCs e presente nos neutrófilos. Além disso, os autores realizaram a caracterização funcional das PMN-MDSCs que, após isoladas dos camundongos, apresentaram sua função característica de suprimir a proliferação de células T CD3+ (Figura 2E-F). Estas células também apresentaram maior expressão de genes imunossupressores característicos como S100A8, S100A9, ARG-1 e VEGF.

b) Além da limitação de se usar um anticorpo anti-Gr1, que culmina na depleção de diversas células PMN, os autores também reconhecem como limitação a colonização dos camundongos *germ free* com uma única cepa de uma única espécie do gênero *Desulfovibrio*, em vez de

colonização com maior diversidade bacteriana. Além destas duas limitações, identifique e descreva pelo menos mais uma limitação do estudo, e proponha um experimento ou controle experimental que solucionaria tal limitação.

Foram consideradas as seguintes limitações e controles experimentais ou experimentos adicionais:

Os autores trataram camundongos em dieta hiperlipídica ou receptores da microbiota associada à dieta hiperlipídica com a droga inibidora da via de mTOR, Everolimus, e avaliaram o crescimento do tumor. No entanto, o tratamento com Everolimus não inativa o mTOR apenas nos progenitores mielóides, mas em todas as células do animal, inclusive nas células tumorais. O *knock out* condicionado de mTOR ou sestrin2 apenas em progenitores mielóides seria mais adequado.

A Figura 4 mostra as alterações do metaboloma com níveis elevados de diversos metabólitos, incluindo quatro aminoácidos de cadeia ramificada. Apesar da Leucina ter sido o metabólico alterado em maior ordem de grandeza, os outros metabólitos, inclusive os outros aminoácidos, também poderiam contribuir para a diferenciação de células supressoras e progressão tumoral acelerada. Os autores poderiam realizar o experimento com a gavagem dos outros aminoácidos, ou outros metabólitos, além da leucina. Por outro lado, o papel da leucina no *pool* de metabólitos poderia ficar mais claro em um experimento no qual se administraria o *pool* de metabólitos após degradação enzimática da leucina.

Os autores trataram os animais em dieta hiperlipídica com antibióticos para avaliar o papel da microbiota alterada mediante obesidade. No entanto, não houve tratamento dos animais do grupo controle (NFD). O tratamento desse grupo com antibióticos permitiria avaliar se há participação da microbiota no crescimento natural do câncer, além daquele crescimento acelerado observado na obesidade.

Os autores mostraram que o inibidor do transporte de aminoácidos neutros BCH impediu a diferenciação em PMN-MDSCs *in vitro* e que a Nimesulida reduziu a diferenciação em PMN-MDSCs e o crescimento do tumor de mama *in vivo*. O uso de um inibidor específico para leucina, ou pelo menos para aminoácidos de cadeia lateral ramificada, seria ideal para suportar as conclusões do artigo. Outra possibilidade, seria a colonização de camundongos com *Desulfovibrio desulfuricans* mutante, deficiente na via de síntese de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina).

O n de 61 mulheres com câncer de mama é um n ligeiramente pequeno para estudos de associação com microbiota, níveis de leucina e infiltração de células mielóides supressoras no tumor. Propõe-se usar um n amostral maior levando em consideração os diversos fatores confundidores como estadiamento do tumor, tratamento quimioterápico, entre outros, apesar do estudo ter considerado poder estatístico de 80 % e análise multivariada.

Os camundongos *germ free* apresentam sistema imunológico imaturo e pouco sensibilizado pela falta de exposição à microorganismos, além de disfunções da permeabilidade da barreira intestinal. A colonização com o gênero *Desulfovibrio* em camundongos *pathogen-free* seria mais adequada e mais semelhante aos animais naturalmente colonizados pela dieta hiperlipídica.

Os autores mostram que a dieta rica em lipídios induz obesidade em camundongos levando à alteração de sua microbiota. No entanto, a dieta rica em gordura não necessariamente reproduz a obesidade induzida por dieta em humanos, que geralmente envolve outras fontes de calorias. Além disso, não fica claro se a alteração da microbiota se deve à obesidade ou à dieta em si. A indução da obesidade por outro tipo de dieta, por exemplo dieta rica em carboidratos, ou por períodos mais curtos de dieta, antes do estabelecimento da obesidade, poderia esclarecer estes pontos.

O Câncer é um conjunto de doenças diversas com diferenças importantes nos mecanismos biológicos relacionados a diferentes tipos de câncer. Embora seja incomum os artigos avaliarem múltiplos cânceres ao mesmo tempo, o artigo em questão só avaliou o câncer de mama e o melanoma. Isso levanta a questão se as alterações da microbiota, com colonização pelo gênero *Desulfovibrio* e elevada produção de leucina teriam importância patofisiológica em outros tipos de câncer. Alguns dos modelos do artigo poderiam ser reproduzidos em animais submetidos a outros tipos de câncer além do câncer de mama e o melanoma.

07. Como o sequenciamento do RNA ribossomal 16S permitiu aos autores identificarem os gêneros e a abundância das bactérias presentes nas amostras fecais de pacientes com câncer de mama estratificadas pelo seu IMC e de camundongos submetidos à uma dieta obesogênica daqueles que tiveram uma dieta balanceada?

O gene 16S rRNA é ideal para identificação de bactérias porque possui regiões altamente conservadas (universais) intercaladas com regiões hipervariáveis que funcionam como "códigos de barras" específicos para cada espécie ou gênero. No caso deste artigo especificamente o sequenciamento de ambas as amostras (humanas ou murinas) mostrou uma abundância relativa aumentada de espécies do gênero *Desulfovibrio* na microbiota intestinal de camundongos com câncer de mama progride mais rapidamente quando submetidas a uma dieta obesogênica rica em gorduras, bem como em humanos com IMC acima de 24.

08. Os dados de expressão do mRNA presentes na figura 3J e 3M indicam que a dieta obesogênica aumentou os níveis dos marcadores de inflamação (S100A8 e S100A9), bem como dos marcadores de tumorigênese (ARG1 e VEGF). Todavia, quando tratados com antibiótico os marcadores reduzem seus níveis influenciados pela microbiota. Esta avaliação das diferenças de expressão pode ser aferida graças a um sistema de comparação relativa normalizado por GADPH usando sonda taqman. Sobre esse resultado indique a afirmativa correta:

Questão anulada: A questão 8 foi anulada e todos os candidatos receberam os 5 pontos relativos a esta questão.

- a) ☐ O gene GADPH foi usado para mostrar que os marcadores de inflamação e tumorigênese são afetados pela microbiota devido ao uso de antibióticos.
- b) ☐ O gene GADPH é um normalizador do qPCR, pois ele acompanha a reação de amplificação juntamente com os genes alvo. Assim, pode-se medir seu crescimento.
- c) ☒ A dieta rica em lipídeos muda a microbiota intestinal e esta modificação afeta a capacidade do soro de induzir genes relacionados à inflamação e à tumorigênese em PMN-MDSC.
- d) ☐ A dieta rica em lipídeos tende a aumentar a expressão dos genes de tumorigênese e inflamação devido a ação de fator de transcrição lipídica.
- e) ☐ Os antibióticos matam todos os microrganismos da microbiota e quando associados à leucina aumentam a expressão dos genes de inflamação e tumorigênese.