



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-graduação em Oncologia

Bruno Nappo Fernandes

**POTENCIAL ATUAÇÃO ANTI-TUMORAL DO EXERCÍCIO FÍSICO NOS
ESTÁGIOS INICIAIS DA CARCINOGENESE DO CÓLON INDUZIDA PELO
AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS**

Orientador: Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Coorientador: Dr. Fernando Tadeu Trevisan Frajacomó

Rio de Janeiro

2020



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-graduação em Oncologia

Bruno Nappo Fernandes

**POTENCIAL ATUAÇÃO ANTI-TUMORAL DO EXERCÍCIO FÍSICO NOS
ESTÁGIOS INICIAIS DA CARCINOGENESE DO CÓLON INDUZIDA PELO
AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS**

Orientador: Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Coorientador: Dr. Fernando Tadeu Trevisan Frajacom

Aprovado em 27/11/2020.

BANCA EXAMINADORA

Dr Martin Hernan Bonamino
Instituto Nacional de Câncer

Dr^a Vanessa Moraes de Andrade
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Dr^a Rossana Colla Soletti
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rio de Janeiro

2020

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL	14
1.2 OS FATORES DE RISCO AMBIENTAIS PARA O CÂNCER COLORRETAL.....	18
.....	20
.....	20
1.3 EXERCÍCIO FÍSICO NA ÁREA DA SAÚDE E A PREVENÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON	20
1.3.1 EXERCÍCIO FÍSICO NA ÁREA DA SAÚDE	20
1.3.2 EXERCÍCIO FÍSICO E A PREVENÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON .	24
1.4 MODELOS QUÍMICOS DA CARCINOGENESE DE CÓLON	27
1.4.1 CARCINÓGENOS UTILIZADOS EM MODELOS QUÍMICOS	27
1.4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NO CÓLON EM MODELOS <i>IN VIVO</i>	29
1.5 PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO EM MODELOS DE CARCINOGENESE <i>IN VIVO</i>	30
1.6 MECANISMOS ANTI-TUMORAIS DO EXERCÍCIO	32
1.7 PAPEL DA EPIGENÉTICA NOS MECANISMOS ANTI-TUMORAIS DO EXERCÍCIO	35
1.8 JUSTIFICATIVA	38
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 ÉTICA E ANIMAIS	40
3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO.....	40
3.3 EXPERIMENTO I – AOM CRÔNICO	41
3.3.1 HISTOLOGIA	42
3.3.2 SEQUENCIAMENTO DO DNA	43
3.4 EXPERIMENTO II – AOM AGUDO.....	45
3.4.1 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	46
3.4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA E DNA	47
3.4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	48
3.4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO	49
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52

4. RESULTADOS	53
4.1 EXPERIMENTO I – AOM CRÔNICO	53
4.2 EXPERIMENTO II – AOM AGUDO	55
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	78
6.1 CONCLUSÃO PRINCIPAL	78
6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. SUPLEMENTARES.....	99
8.1 NÍVEL DE METILAÇÃO DOS SÍTIOS CPG ANALISADOS EM <i>MLH1</i> ...	99
8.2 TESTE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE DNMT3A E APOBEC3 E OS NÍVEIS DE METILAÇÃO DE MGMT DO CÓLON DOS ANIMAIS EXERCITADOS.....	99
9. ANEXOS	101
9.1 APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA)	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Gráfico de incidência e mortalidade de câncer em ambos os sexos no mundo. Fonte: Adaptado de (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL <i>et al.</i> , 2018).	14
Figura 1.2: Taxas globais de incidência (A) e mortalidade (B) do câncer colorretal ajustadas por idade em 2018, em ambos os sexos. Fonte: Adaptado de World Health Organization (https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map , acesso em 21/04/2020)	15
Figura 1.3: (A) Prevalência de excesso de peso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e (B) prevalência de obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) na população adulta (≥ 18 anos) no Brasil (2006-2019). Fonte: Adaptado de (VIGITEL, 2020).	17
Figura 1.4: Mapa de prevalência de inatividade física em 2016, (A) em homens; (B) em mulheres. Fonte: Adaptado de (GUTHOLD; STEVENS; RILEY; BULL, 2018).	17
Figura 1.5: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: Adaptado de (INCA, 2019).	18
Figura 1.6: Quadro no nível de evidência acerca da relação entre atividade física e risco de câncer. Fonte: Adaptado de (WCRF; AICR, 2018).	20
Figura 1.7: Risco de desenvolver câncer de cólon e o acúmulo semanal de MET/h. Fonte: Adaptado de (CHAO, ANN; CONNELL, CARI J; JACOBS, ERIC J; MCCULLOUGH, MARJORIE L <i>et al.</i> , 2004).	27
Figura 1.8: Mecanismo de indução de tumores no cólon pelo modelo químico com azoximetano (AOM); CYP2E1: Citocromo P450 2E1.	28
Figura 1.9: Processos celulares e reparo da lesão O ⁶ meG no DNA; O6-metilguanina (O6MeG); O6-metilguanina-DNA metiltransferase (Mgmt); Reparo de Mismatch (MMR). Fonte: Adaptado de (FU, DRAGON; CALVO, JENNIFER A; SAMSON, LEONA D, 2012).	29
Figura 1.10: Mecanismos epigenéticos por modificação de histonas, metilação do DNA e atuação de RNAs não codificantes; SAM (<i>S-Adenosyl methionine</i>); HDM (<i>Histone desmethylase</i>); HDAC (<i>Histone deacetylase</i>); SAH (<i>S-Adenosyl-</i>	

L-homocysteine); **5hmC** (*5-Hydroxymethylcytosine*); **5fC** (*5-Formylcytosine*); **5caC** (*5-carboxylcytosine*); **5hmU** (*5-hydroxymethyluracil*); **TET** (*Ten-eleven translocation*); **AID** (*Activity-induced cytidine deaminase*); **APOBEC** (*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme*); **DNMT** (*DNA methyltransferase*); **mRNA** (RNA mensageiro). Fonte: Adaptado de (CAMUZI; DE AMORIM; RIBEIRO PINTO; OLIVEIRA TRIVILIN *et al.*, 2019)..... 36

Figura 3.1: Protocolo de natação. Coluna azul (eixo X): Duração do treinamento (minutos); Linha laranja (eixo Z): Carga (% do peso total do animal); Eixo Y: Tempo decorrido no protocolo (D = dias; S = semanas)..... 41

Figura 3.2: Grupos do Experimento I. Tratamento crônico de azoximetano, sem exercício (AOM_CR); Exercício prévio ao tratamento crônico de azoximetano (EX_PRE); Exercício concomitante ao Tratamento crônico de azoximetano (EX_DUR). Duas semanas após a última dose de azoximetano todos os grupos foram eutanasiados. 42

Figura 3.3: Grupos do Experimento II. Controle sem exercício (CON); Controle com exercício (EX); sem exercício, tratado com azoximetano (AOM); exercitado e tratado com azoximetano (EXAOM). A eutanásia nos grupos com tratados com azoximetano foi subdividida em 8 ou 24 horas após a injeção de carcinógeno. 46

Figura 4.1: Marcadores histológicos de lesões precursoras de tumor no cólon pela coloração por hematoxilina e eosina (A e B) e alcian blue (C e D). (A) CA: Cripta aberrante (400x); (B) FCA: Foco de cripta aberrante (FCA) (400x); (C) CDM: Cripta com depleção de mucina (400x); (D) FDM: Foco com depleção de mucina (200x). 54

Figura 4.2: Avaliação da formação de quebras-duplas do DNA por imunohistoquímica. (A) Fotos ilustrativas da marcação de γ H2AX por imunohistoquímica (A1=Criptas sem marcação de γ H2AX; A2=Criptas com marcação positiva de γ H2AX); Seta preta: foco de γ H2AX; (B) Criptas com marcação positiva para γ H2AX ajustado pelo total de criptas; Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de *Dunn*; * $p < 0,05$. AOM_24h vs. EXAOM_24h, *Two-way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni..... 57

Figura 4.3: Expressão gênica de *Mgmt* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Mgmt* nos grupos controles (CON e EX); (B) Níveis de mRNA de *MGMT* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); * $p < 0,05$ CON

vs. EXAOM_8h, One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; ** $p < 0,005$ CON vs. AOM_24h, Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. 58

Figura 4.4: Expressão gênica de *Mlh1* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Mlh1* nos grupos controles (CON e EX); Teste de Mann Whitney; (B) Níveis de mRNA de *Mlh1* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. 58

Figura 4.5: Perfil de metilação de *Mgmt*. (A) Grupos CON e EX (Metilação de CpG 1, 2, 3 e média); ** $p < 0,005$ CON vs. EX, Teste T não-pareado (Média e CpG2); * $p < 0,05$ CON vs. EX, Teste de Mann Whitney (CpG1 e 3); (B) Grupos CON, AOM e EXAOM, 8 e 24h pós-dose (Metilação média); * $p < 0,05$. CON vs. AOM_24h, Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni;..... 59

Figura 4.6: Correlação entre os níveis de metilação e de expressão de *Mgmt* (Coeficiente de correlação de Pearson) nos grupos CON (n=10) e EX (n=10). (A) Correlação entre metilação e expressão de *Mgmt* no grupo CON; (B) Correlação entre metilação e expressão de *Mgmt* no grupo EX. 60

Figura 4.7: Expressão gênica de *Tet2* e *Dnmt1* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Tet2* nos grupos controles (CON e EX); Teste T não-pareado; (B) Níveis de mRNA de *Tet2* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; (C) Níveis de mRNA de *Dnmt1* nos grupos controles (CON e EX); Teste T não-pareado; (D) Níveis de mRNA de *Dnmt1* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. ... 61

Figura 4.8: Expressão gênica de *Dnmt3a* e *Apobec3* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Dnmt3a* nos grupos controles (CON e EX); Teste de Mann Whitney; (B) Níveis de mRNA de *Dnmt3a* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; (C) Níveis de mRNA de

<i>Apobec3</i> nos grupos controles (CON e EX); * $p < 0,0001$ EX vs. CON, Teste T não-pareado; (D) Níveis de mRNA de <i>Apobec3</i> nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.....	62
Figura 4.9: Perfil de metilação de <i>Line-1</i> (%). (A) Grupos CON e EX; Teste T não-pareado; (B) Grupos CON, AOM e EXAOM, 8 e 24h pós-dose; * $p < 0,05$ AOM_24h vs. CON, Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni;.....	63
Figura suplementar 8.1: Perfil de metilação média de <i>Mlh1</i> nos grupos CON e EX; Teste de Mann Whitney.....	99
Figura suplementar 8.2: (A) Correlação entre a expressão gênica de <i>Apobec3</i> e os níveis de metilação de <i>Mgmt</i> no grupo EX (n=10); (B) Correlação entre a expressão gênica de <i>Dnmt3a</i> e os níveis de metilação de <i>Mgmt</i> no grupo EX (n=10); Teste de correlação por Coeficiente de correlação de Pearson.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Estudos com impacto do exercício físico sobre a tumorigênese do cólon induzida por modelos químicos.....	32
Tabela 3.1: Sequências dos primers utilizados na amplificação para o sequenciamento.....	44
Tabela 3.2: Sequências dos primers utilizados na amplificação dos genes alvo por qPCR.....	49
Tabela 3.3: Sequências dos primers utilizados na amplificação para pirosequenciamento.....	52
Tabela 4.1: Ganho do peso total e peso relativo do coração e da gordura epididimal dos camundongos durante as quatorze semanas de experimento...	53
Tabela 4.2: Incidência e multiplicidade de focos de lesões pré-neoplásicas no cólon	54
Tabela 4.3: Ganho do peso total e peso relativo do coração e da gordura epididimal dos camundongos durante as seis semanas de experimento II.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5caC	<i>5-carboxylcytosine</i>
5fC	<i>5-Formylcytosine</i>
5hmC	<i>5-Hydroxymethylcytosine</i>
5hmU	<i>5-hydroxymethyluracil</i>
ACSM	<i>American College of Sport Medicine</i>
AICR	<i>American Institute of Cancer Research</i>
AID	<i>Activity-induced cytidine deaminase</i>
AOM	Azoximetano
APC	<i>APC regulator of WNT signaling pathway</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
<i>BRCA</i>	<i>BRCA DNA repair associated</i>
CA	Cripta Aberrante
CACNA2D3	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2 Delta3</i>
CDM	Cripta com depleção de mucina
cDNA	DNA complementar
CIMP	Fenótipo metilador de ilhas CpG
CTNNB1	Catenin beta 1
CYP2E1	<i>Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1</i>
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCA	Foco de cripta aberrante
FDM	Foco com depleção de mucina
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HDM	<i>Histone desmethylase</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HIIT	Treinamento intervalado de alta intensidade
IDH	Índice de desenvolvimento humano

IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IMC	Índice de massa corporal
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
L3MBTL1	<i>Lethal 3 malignant brain tumor-like 1</i>
MAM	Metilazoximetanol
MET	Equivalente Metabólico da Tarefa
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
miRNA	MicroRNA
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Reparo por <i>Mismatch</i>
MNMG	Metilnitrosolamida
mRNA	RNA mensageiro
MSI	Instabilidade microssatélite
NK	<i>Natural Killer</i>
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
O ⁶ MeG	O ⁶ -metilguanina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RASSF1A	<i>Ras Association Domain Family Member 1</i>
RONS	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
RR	Risco relativo
RT	Transcriptase reversa
RUNX3	<i>RUNX family transcription factor 3</i>
SAH	<i>S-Adenosyl-L-homocysteine</i>
SAM	<i>S-Adenosyl methionine</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and cysteine rich</i>
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
VO ₂ Máx	Consumo máximo de oxigênio
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i>



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de pós-graduação

POTENCIAL ATUAÇÃO ANTI-TUMORAL DO EXERCÍCIO FÍSICO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DA CARCINOGENESE DO CÓLON INDUZIDA PELO AZOXIMETANO EM CAMUNDONGOS

RESUMO DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Bruno Nappo Fernandes

Introdução: Evidências epidemiológicas consolidadas mostram uma relação inversa entre maiores níveis de atividade física e o menor risco de desenvolver câncer de cólon. Ademais, estudos com roedores mostram uma menor incidência de lesões pré-neoplásicas e de tumores de cólon em resposta ao exercício aeróbio regular. No entanto, ainda não são claros os mecanismos por trás desse efeito anti-tumoral do exercício, especialmente nos estágios iniciais da iniciação tumoral. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício sobre mecanismos de iniciação tumoral e da subsequente formação de lesões pré-neoplásicas no cólon pela exposição de camundongos ao azoximetano (AOM). **Métodos:** Realizamos dois experimentos *in vivo* com a administração de AOM (exposição crônica e aguda) combinados ou não a um protocolo de natação. No experimento I (6 semanas de exposição a AOM), trinta camundongos machos C57/BL6 foram divididos em três grupos: Não exercitado e cronicamente exposto ao AOM (AOM_CR, n = 10); Exercitado antes da exposição crônica a AOM (EX_PRE, n = 10); Exercitado durante a exposição crônica ao AOM (EX_DUR, n = 10). No experimento II (exposição a uma dose de AOM e acompanhamento por 24 horas), quarenta camundongos machos C57/BL6 foram divididos em quatro grupos: Controle não exercitado (CON, n = 10); Controle exercitado (EX, n = 10); Não exercitado e exposto ao AOM (AOM, n = 10); Exercitado e exposto ao AOM (EXAOM, n = 10). Ambos os grupos expostos ao AOM foram subdivididos em dois momentos de eutanásia, 8 ou 24 horas após a injeção do carcinógeno. **Resultados:** Nos camundongos cronicamente expostos a AOM (experimento I), apenas o grupo EX_PRE apresentou menor formação de focos com depleção de mucina (FDM) no cólon. No experimento II, 24 horas após a dose única de AOM, o grupo EXAOM teve uma formação 5 vezes menor de quebras-duplas do DNA no cólon em comparação com o grupo não exercitado. O grupo EXAOM apresentou maiores níveis basais de metilação na região promotora de *Mgmt* no cólon, porém, sem alterações em sua expressão gênica. O grupo EX apresentou também uma maior expressão gênica basal de *Dnmt3a* e uma expressão 3 vezes menor de *Apobec3* no cólon em comparação ao grupo CON. No entanto, não houve correlação entre a expressão desses genes e os maiores níveis de metilação na região promotora de *Mgmt* nos animais exercitados. **Conclusão:** O protocolo de exercício aeróbio, em particular quando realizado antes da exposição crônica ao carcinógeno, preveniu a formação de lesões pré-neoplásicas no cólon. Observamos que o exercício físico pode atuar na prevenção dessas lesões por desencadear uma menor formação de dano no DNA frente aos insultos genotóxicos gerados pelo carcinógeno, favorecendo a proteção do tecido do cólon contra a carcinogênese desde a fase de iniciação tumoral.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de pós-graduação

ANTI-TUMORAL POTENTIAL EFFECT OF EXERCISE IN EARLY STAGES OF COLON CARCINOGENESIS INDUCED BY AZOXYMETAN IN MICE

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION

Bruno Nappo Fernandes

Introduction: Strong epidemiological evidence show that higher levels of physical activity are inversely associated with colon cancer risk. In addition, rodent studies have shown a lower incidence of pre-neoplastic lesions and colon tumors in response to regular aerobic exercise. However, the mechanisms underlying this anti-tumoral effect of exercise remains unclear, especially in early stages of tumor initiation. **Objective:** The objective of this study was to investigate the effects of exercise on the mechanisms of the tumor initiation and the subsequent formation of pre-neoplastic lesions in the colon of mice exposed to azoxymethane (AOM). **Methods:** We conducted two *in vivo* experiments with AOM (chronic and single exposure) combined or not to a swimming protocol. In the experiment I (6 weeks exposure to AOM), thirty male C57/BL6 mice were divided into three groups: Non-exercised and chronically exposed to AOM (AOM_CR, n=10); Exercised before chronic exposure to AOM (EX_PRE, n=10); Exercised during chronic exposure to AOM period (EX_DUR, n=10). In experiment II (single exposure to AOM and 8 or 24hs follow up), forty male C57/BL6 mice were divided into four groups: Non-exercised control (CON, n=10); Exercised control (EX, n=10); Non-exercised and AOM-exposed (AOM, n=10); Exercised and AOM-exposed (EXAOM, n=10). Both AOM-exposed groups were subdivided in two moments of euthanasia, 8 or 24 hours after carcinogen injection. **Results:** Among the chronically AOM-exposed mice (experiment I), only the EX_PRE group induced a lower formation of pre-neoplastic lesions in the colon. In experiment II, 24 hours after the single dose of AOM, the EXAOM group had a 5-fold lower DNA double-strand break formation in the colon compared to the non-exercise group. The exercise induced higher baseline levels of methylation in *Mgmt* promoter region in the colon, but without changes in its gene expression. The EX group also showed a higher baseline gene expression of *Dnmt3a* and a 3-fold lower expression of *Apobec3* in the colon compared to the CON group. However, there was no correlation between the expression of these genes and the high levels of methylation in *Mgmt* in exercised animals. **Conclusion:** The aerobic exercise protocol, particularly when performed before chronic exposure to the carcinogen, prevented the formation of pre-neoplastic lesions in the colon. We observed that regular exercise could act in the prevention of these lesions by lowering DNA damage formation in the face of the genotoxic insults generated by the carcinogen, protecting the colon tissue from carcinogenesis since early stages of tumor initiation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal é o 3º mais incidente e o 2º câncer de maior mortalidade no mundo (Figura 1.1) (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Em 2018, foram documentados 1.800.977 novos casos de câncer colorretal no mundo, sendo 1.096.601 de cólon e 704.376 de reto, o que representa 10% dos casos de câncer no mundo, indicando um grave problema de saúde pública global.

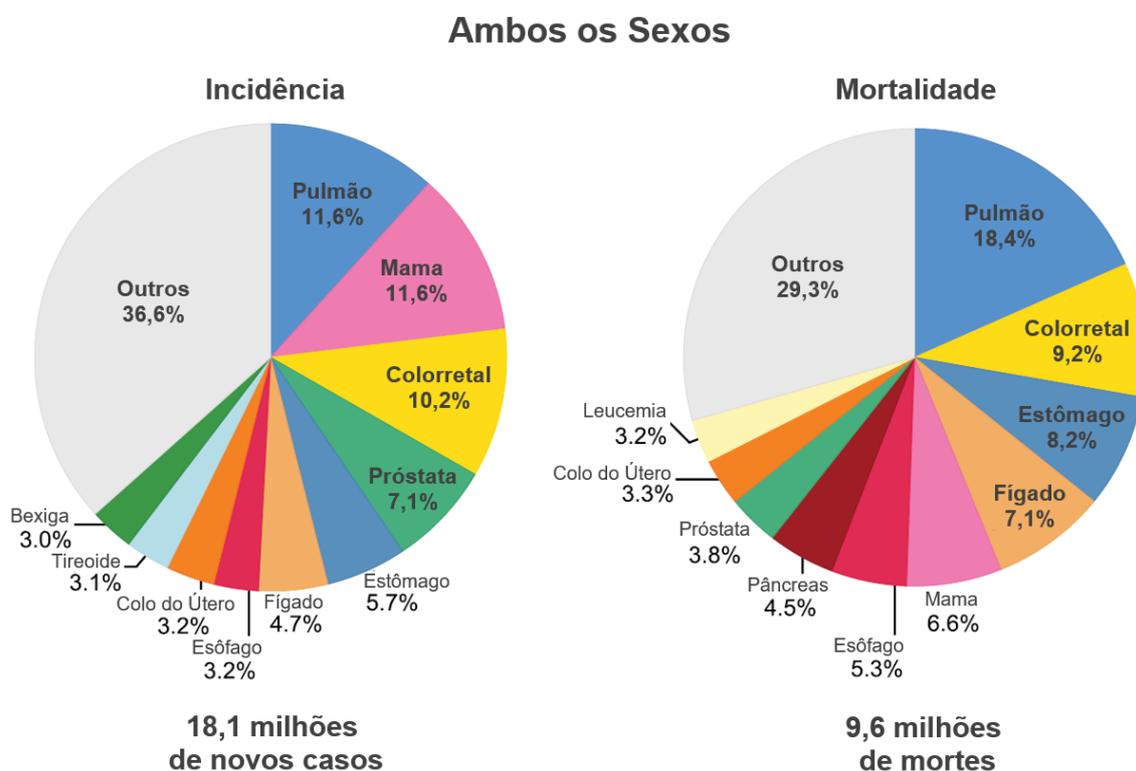


Figura 1.1: Gráfico de incidência e mortalidade de câncer em ambos os sexos no mundo. Fonte: Adaptado de (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018).

As maiores taxas de incidência estão presentes em países desenvolvidos, seguido pelos países em desenvolvimento como China, Rússia, Brasil, entre outros (Figura 1.2). A incidência de câncer colorretal em países desenvolvidos é cerca de três vezes maior do que em países em desenvolvimento e seis vezes maior que países de baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) (ARNOLD; SIERRA; LAVERSANNE; SOERJOMATARAM *et al.*, 2017; BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Enquanto no Sul Europeu, a taxa de incidência é estimada em 15,9 a 25,4 casos a cada 100 mil habitantes, em países

africanos sua incidência varia entre 2 a 5,7 casos a cada 100 mil habitantes (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Por outro lado, a mortalidade em países com baixo IDH é de duas a três vezes maior que países de alto/altíssimo IDH, representando um provável reflexo dos avanços em detecção precoce, rastreamento e opções de tratamento nos países de alto/altíssimo IDH (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018; RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2019).

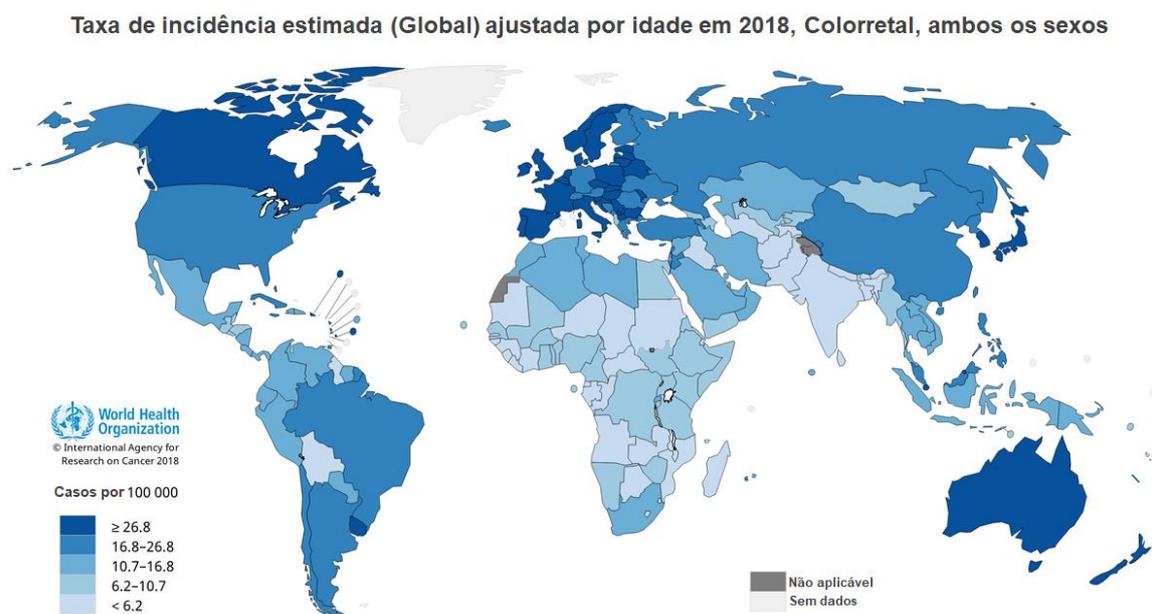


Figura 1.2: Taxas globais de incidência (A) e mortalidade (B) do câncer colorretal ajustadas por idade em 2018, em ambos os sexos. Fonte: Adaptado de World Health Organization (<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>, acesso em 21/04/2020)

Tumores colônicos podem se apresentar em duas formas. A forma esporádica (90-95% dos casos) e a forma hereditária (5-10% dos casos), cuja patogenicidade está ligada a síndromes hereditárias bem definidas como a síndrome de *Lynch* e a Polipose Adenomatosa Familiar (MARMOT; ATINMO; BYERS; CHEN *et al.*, 2007). A forma esporádica desse câncer é a mais prevalente e afeta principalmente indivíduos com idades mais avançadas, visto que sua etiologia está ligada ao longo tempo de exposição aos fatores de risco ambientais (os fatores de risco ao câncer colorretal serão detalhados no item 1.2) (MARMOT; ATINMO; BYERS; CHEN *et al.*, 2007; MEYERHARDT; MANGU; FLYNN; KORDE *et al.*, 2013).

Apesar do câncer de cólon ser o 3º mais incidente no mundo em homens e o 2º em mulheres, os homens apresentam 50% maior risco de desenvolver câncer colorretal que mulheres (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Contudo, mulheres são mais propensas a desenvolver neoplasias no cólon proximal (HANSEN; JESS, 2012). Tumores colônicos proximais são associados a maior agressividade, o que resulta em uma pior sobrevida em cinco anos para mulheres acima dos setenta anos em comparação aos homens com a mesma neoplasia (PARK; SHIN; KIM; JUNG *et al.*, 2013). A razão dessas diferenças entre os gêneros ainda é desconhecida, mas uma das hipóteses é a possível diferença na exposição aos fatores de risco entre os gêneros.

O câncer colorretal é considerado um marcador de desenvolvimento socioeconômico na medida que seus níveis de incidência acompanham o aumento do IDH (FIDLER; SOERJOMATARAM; BRAY, 2016). Tem se observado ao longo dos anos uma redução nas taxas de incidência e mortalidade em países desenvolvidos e uma tendência de aumento dessas taxas em países emergentes (ARNOLD; SIERRA; LAVERSANNE; SOERJOMATARAM *et al.*, 2017). O estilo de vida atribuído aos países de alto/altíssimo IDH, chamado de “estilo de vida ocidental”, comporta vários hábitos de risco para o câncer colorretal, como uma dieta pobre em fibras, vegetais e rica em gordura e alimentos processados, altos níveis de sedentarismo e de sobrepeso e obesidade (BRAY, 2014). A população dos países em desenvolvimento, junto com o crescimento econômico passam a adotar aos poucos o “estilo de vida ocidental”. Esse fenômeno ajuda a explicar o aumento nas taxas de incidência e mortalidade de cânceres relacionados aos hábitos de risco nos países emergentes.

Essa transição epidemiológica pode ser claramente observada no Brasil. Um país emergente com um crescimento socioeconômico acelerado, saindo de um baixo IDH na década de 90 para um alto IDH a partir de 2010 (PINTO; COSTA; MARQUES, 2013). Nos últimos 20 anos, as taxas de obesidade e sobrepeso na população brasileira vem aumentando rapidamente (IBGE, 2015; VIGITEL, 2020). A figura 1.3 mostra um aumento na taxa de prevalência de obesidade (8,1% e 8,9%, em homens e mulheres, respectivamente) e de sobrepeso (9,6% e 15%, em homens e mulheres, respectivamente) entre o período de 2006 a 2019 na população adulta brasileira (VIGITEL, 2020).

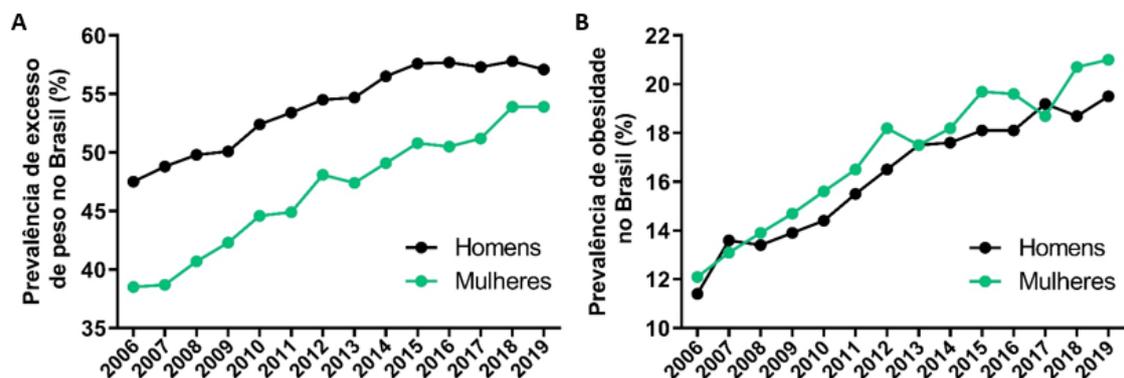


Figura 1.3: (A) Prevalência de excesso de peso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e (B) prevalência de obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) na população adulta (≥ 18 anos) no Brasil (2006-2019). Fonte: Adaptado de (VIGITEL, 2020).

Além disso, entre os anos de 2001 e 2016, a população brasileira apresentou um aumento superior à 15% nos níveis de inatividade física (GUTHOLD; STEVENS; RILEY; BULL, 2018). Atualmente, o Brasil é apontado como o país mais sedentário das Américas e possui uma das maiores taxas de prevalência de sedentarismo do mundo (Figura 1.4). No país, 47% (40,4% dos homens e 53,3% das mulheres) da população adulta não atinge as recomendações mínimas de atividade física da Organização Mundial de Saúde (OMS).

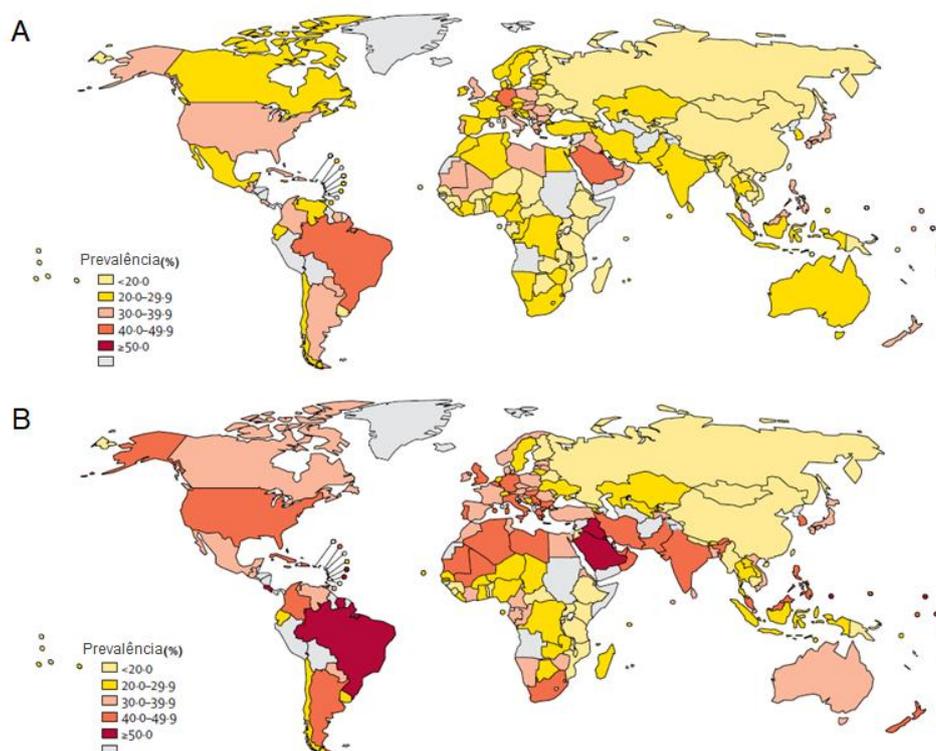


Figura 1.4: Mapa de prevalência de inatividade física em 2016, (A) em homens; (B) em mulheres. Fonte: Adaptado de (GUTHOLD; STEVENS; RILEY; BULL, 2018).

É possível estabelecer um paralelo entre essa transição socioeconômica no Brasil e as taxas de incidência de cânceres com etiologia ligada aos hábitos de vida “ocidentais”. Embora não seja possível estabelecer uma relação causal por estimativas, pode-se observar as tendências quanto à ordem dos cânceres mais incidentes no Brasil. Assim, em 2002, o câncer colorretal encontrava-se como o 4º mais incidente e o câncer de endométrio (câncer associado a obesidade) não se encontrava entre os dez mais incidentes (INCA, 2002). Nas estimativas para 2020, o câncer de colorretal é o 2º mais incidente e o de endométrio o 8º entre as mulheres (Figura 1.5) (INCA, 2019). Indo de encontro a essas estimativas, o Brasil foi identificado como pertencente ao grupo de países que ao longo das últimas décadas apresentou um padrão crescente das taxas de incidência e mortalidade do câncer colorretal, segundo os dados do *Globocan* (ARNOLD; SIERRA; LAVERSANNE; SOERJOMATARAM *et al.*, 2017). Esses dados sugerem um aumento na importância de doenças relacionadas a um “estilo de vida ocidental” e do seu impacto sobre a população brasileira.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.5: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: Adaptado de (INCA, 2019).

1.2 OS FATORES DE RISCO AMBIENTAIS PARA O CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal esporádico tem sua etiologia atrelada principalmente a hábitos de vida como a dieta, etilismo, tabagismo, obesidade/sobrepeso e inatividade física (MARMOT; ATINMO; BYERS; CHEN *et al.*, 2007).

Alguns estudos mostram que componentes da dieta possivelmente oferecem proteção contra o câncer colorretal, dentre eles, grãos integrais, suplementação de cálcio, fibra alimentar, frutas e verduras (WCRF, 2018). Já

outros alimentos podem aumentar o risco desses tumores, como o consumo de carne vermelha, carne processada e alimentos gordurosos (CLINTON; GIOVANNUCCI; HURSTING, 2020). Muitos desses fatores alimentares contribuem para um quadro de disbiose intestinal (VIPPERLA; O'KEEFE, 2016). A disbiose é a quebra na homeostase da microbiota intestinal, provocada pelo desequilíbrio na composição bacteriana. Uma vez alterada, a microbiota intestinal disfuncional produz metabólitos que contribuem para uma série de distúrbios como obesidade, síndromes metabólicas e para o câncer de cólon (GAO; GUO; GAO; ZHU *et al.*, 2015).

Uma consequência de uma má alimentação e da disbiose são as doenças intestinais inflamatórias como a colite ulcerativa e a doença de *Crohn* (QIN, 2012). A exposição crônica às doenças intestinais inflamatórias é associada ao aumento do risco de desenvolver câncer de cólon (NADEEM; KUMAR; AL-ABBASI; KAMAL *et al.*, 2020).

O consumo de álcool e tabaco também são fatores de risco para câncer colorretal (WCRF, 2018). Para que haja um aumento no risco é necessário o consumo de pelo menos duas doses por dia de bebidas alcoólicas (FEDIRKO; TRAMACERE; BAGNARDI; ROTA *et al.*, 2011). A carga tabágica demonstrou maiores riscos para tumores de reto do que de cólon, mas o risco aumenta em ambos (LIANG; CHEN; GIOVANNUCCI, 2009). Mais de uma variável de dose-resposta demonstrou associação com maior risco da doença, dentre elas, o consumo diário de cigarro (quarenta cigarros/dia = 38% maior risco), tempo de uso (quarenta anos de uso = 20% maior risco) e maços por ano (sessenta maços/ano = 51% maior risco).

O excesso de peso corporal está associado ao risco de 13 tipos de tumores, e dentre eles, o câncer colorretal (HIDAYAT; ZHOU; SHI, 2020). O excesso de tecido adiposo promove alterações metabólicas e hormonais no organismo, com favorecimento de um estado pró-inflamatório sistêmico. Este quadro inflamatório sistêmico de baixo grau contribui para a etiologia de síndromes metabólicas, doenças cardiovasculares e na carcinogênese de diversos tecidos (ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2010). A circunferência de cintura e o índice de massa corporal são os parâmetros usados em estudos epidemiológicos para determinar sobrepeso e obesidade. Nos dois parâmetros os resultados são similares, comparados a pessoas com peso ideal, indivíduos

obesos possuem de 30-40% maior risco de desenvolver tumores colorretais (DONG; ZHOU; ZHU; LUO *et al.*, 2017; HONG; CAI; CHEN; ZHU *et al.*, 2012; MA; YANG; WANG; ZHANG *et al.*, 2013; WCRF, 2018). Já o sobrepeso aumenta esse risco em 8-10% (WCRF, 2018). As diferenças do impacto do excesso de peso no risco de câncer colorretal entre os sexos é um assunto controverso na literatura, pois os dados se mostram heterogêneos e variam de acordo com o parâmetro utilizado (ABAR; VIEIRA; AUNE; SOBIECKI *et al.*, 2018).

Segundo o *World Cancer Research Fund* (WCRF) e a *American Institute of Cancer Research* (AICR) há um nível convincente de evidências acerca da associação entre atividade física e o menor risco de câncer de cólon, mas não para tumores de reto (Figura 1.6) (BAMES; BEHRENS; BENDEN; BIDDLE *et al.*, 2012; WCRF; AICR, 2018). A relação entre exercício físico e câncer colorretal será aprofundada no item 1.3.

ATIVIDADE FÍSICA E O RISCO DE CÂNCER			
CLASSIFICAÇÃO WCRF/AICR		REDUÇÃO DO RISCO	
		Exposição	Câncer
EVIDÊNCIA FORTE	Convincente	Atividade Física	Colorretal (Cólon)
	Provável	Atividade Física	Mama (Pós-menopausa) Endométrio
		Atividade Física de alta-intensidade	Mama (Pré-menopausa e pós-menopausa)

Figura 1.6: Quadro no nível de evidência acerca da relação entre atividade física e risco de câncer. Fonte: Adaptado de (WCRF; AICR, 2018).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO NA ÁREA DA SAÚDE E A PREVENÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON

1.3.1 EXERCÍCIO FÍSICO NA ÁREA DA SAÚDE

Foi após as observações de Morris e colaboradores (1953) (MORRIS; HEADY; RAFFLE; ROBERTS *et al.*, 1953) sobre inatividade física e risco de doenças arteriais coronarianas que os olhos da comunidade científica se abriram

para a importância do exercício físico para a saúde. Esse estudo observacional da década de 50 comparou a incidência de doenças coronarianas em motoristas de ônibus com seus cobradores. Enquanto os motoristas passavam horas sentados, os cobradores subiam e desciam vários lances de escadas para cobrar a tarifa da passagem. Os resultados apresentaram um maior risco de morte por doença arterial coronariana em motoristas que em cobradores (31% vs. 19%), sugerindo um efeito protetor da atividade física laboral. Em sua série epidemiológica, os autores também observaram que trabalhadores de escritórios enfartavam mais que os carteiros que percorriam a cidade fazendo as entregas, reforçando na época a hipótese que homens em trabalhos mais fisicamente ativos possuíam menor risco de morrer por doenças cardiovasculares. Anos mais tarde uma grande e famosa coorte de mais de 30 anos feita na cidade de Framingham associou também o sedentarismo a diversas doenças cardiovasculares (KANNEL; SORLIE, 1979).

A implementação do exercício na prática clínica começou com o conceito de reabilitação cardíaca. Um estudo longitudinal que fortaleceu essa mudança da prática clínica foi o *Dallas Bed Rest Study* publicado na revista *Circulation* (SALTIN, 1968) na década de 70 e seu seguimento 30 anos depois (MCGUIRE; LEVINE; WILLIAMSON; SNELL *et al.*, 2001). Na década de 70, logo depois de sofrer algum evento cardiovascular, os pacientes após evento de infarto agudo do miocárdio eram encaminhados para recuperação passiva no leito por semanas. Este estudo pioneiro apontou para o rápido descondicionamento da capacidade cardiopulmonar medida pelo consumo máximo de oxigênio em esforço ($VO_2Máx$). Em contrapartida, esse rápido descondicionamento por repouso passivo no leito (3 semanas) foi revertido com 8 semanas de treinamento aeróbio intenso. Esses dados alertaram a comunidade científica sobre os malefícios do leito prolongado e iniciou uma nova era de reabilitação cardiovascular.

A prática de atividade física passou a ser recomendada não só como fator preventivo, mas também para a manutenção da saúde de pacientes com diversas enfermidades (PEDERSEN; SALTIN, 2015). A avaliação do condicionamento físico dos pacientes passou a ser utilizada como um parâmetro importante para guiar a conduta clínica e estratificar pacientes de risco visando iniciar a intervenção terapêutica em estágios precoces. Dentre os parâmetros

funcionais mais investigados na prática clínica estão: I) capacidade funcional, parâmetro indicativo do condicionamento aeróbio ou capacidade do indivíduo em extrair o máximo volume de oxigênio pelo teste do VO₂máx (FLEG; PINA; BALADY; CHAITMAN *et al.*, 2000); II) Força muscular, parâmetro indicativo da qualidade muscular, como o teste de preensão palmar (*handgrip* test) por dinamometria em membros superiores (BOHANNON, 2015), ou teste funcional de sentar e levantar por 30 segundos para membros inferiores (TANG; ENG; KRASSIOUKOV, 2012). Acredita-se que a inclusão de testes físico-funcionais de fácil aplicação na clínica, sistematizados e capazes de avaliar diferentes valências físicas possa melhorar o poder diagnóstico de indivíduos de alto risco de morbidades ao tratamento e iniciar precocemente um programa de reabilitação física. Na literatura de câncer, o uso sistemático de testes físicos permanece limitado. Contudo, um crescente volume de estudos indica que a avaliação da força muscular e do condicionamento aeróbio pré-tratamento se mostraram marcadores prognósticos independentes em prever risco cirúrgico (LEE; KONG; ISMAIL; RIEDEL *et al.*, 2018; WEST; LYTHGOE; BARBEN; NOBLE *et al.*, 2014), fadiga oncológica (HELDENS; BONGERS; LENSSEN; STASSEN *et al.*, 2017), tempo de internação (KARLSSON; EGENVALL; FARAHNAK; BERGENMAR *et al.*, 2018) e mortalidade (VERSTEEG; BLAUWHOFF-BUSKERMOLEN; BUFFART; DE VAN DER SCHUEREN *et al.*, 2018). Um estudo observacional prospectivo do nosso grupo com pacientes de tumores hematológicos mostrou que a força de preensão palmar caiu de forma significativa logo na primeira semana de início do tratamento oncológico, sugerindo a avaliação de força muscular como um marcador fisiológico sensível e precoce na clínica oncológica (TEODOZIO; CHAVES; ARCURI; FRAJACOMO, 2018).

Após décadas de estudos a respeito das possibilidades terapêuticas do exercício físico e sua importância na saúde em geral, hoje a inatividade física é reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública do mundo, gerando um custo global que chega aos 145 bilhões de dólares por ano (DING; LAWSON; KOLBE-ALEXANDER; FINKELSTEIN *et al.*, 2016; PEDERSEN, 2019). Atualmente, é bem estabelecido o valor preventivo e terapêutico do exercício físico sobre diversas doenças crônicas não-transmissíveis além das doenças cardiovasculares, dentre elas, o diabetes, distúrbios neurológicos,

doenças respiratórias crônicas e alguns tipos de câncer (ANDERSON; DURSTINE, 2019; PEDERSEN, 2019). Esse grupo de doenças é a principal causa de morte no mundo (aproximadamente 70%) e sua prevalência na sociedade representa um grande problema econômico, não só em despesas com a saúde pública, mas também na queda de produtividade da população doente (ANDERSON; DURSTINE, 2019; FOROUZANFAR; AFSHIN; ALEXANDER; ANDERSON *et al.*, 2016). Por essa razão, o exercício físico ganhou importância na área da saúde e tem sido estudado e implementado como uma estratégia não-invasiva, de baixo custo e alta efetividade na prevenção e tratamento de diversas doenças.

A área de exercício em oncologia vem ganhando espaço, contudo, seus primeiros estudos surgiram na década de 80. Apesar das limitações da época, o primeiro estudo a investigar o impacto da atividade física no risco de câncer foi um estudo retrospectivo com 2.950 homens (20 a 64 anos) na Califórnia (EUA) (GARABRANT; PETERS; MACK; BERNSTEIN, 1984). Os autores primeiro classificaram a ocupação dos indivíduos de acordo com o nível de atividade física exigida, separando-as como alta, moderada e sedentária. Depois determinaram o risco de câncer colorretal em cada grupo e observaram que o grupo com trabalhos sedentários apresentavam 60% maior risco de câncer de cólon que o grupo com alta exigência de atividade física. Nenhuma associação com tumores no reto foi encontrada. Logo em seguida, outros estudos começaram a apontar a mesma relação entre maior envolvimento com atividade física e menor risco de câncer de cólon em homens e de câncer de mama em mulheres (FREDRIKSSON; BENGTSSON; HARDELL; AXELSON, 1989; FRISCH; WYSHAK; ALBRIGHT; ALBRIGHT *et al.*, 1985; SHEPHARD, 1990; THUNE; BRENN; LUND; GAARD, 1997; VENA; GRAHAM; ZIELEZNY; SWANSON *et al.*, 1985). Em 1989 foi feito o primeiro estudo clínico com exercício e pacientes com câncer, transpondo a barreira entre o exercício e a prática clínica (WINNINGHAM; MACVICAR; BONDOC; ANDERSON *et al.*, 1989). Os autores atestaram a segurança de um protocolo de exercício aeróbico em pacientes com câncer de mama durante o tratamento por quimioterapia adjuvante e observaram alterações positivas na composição corporal, a perda de gordura e ganho de massa magra com o protocolo de exercício. Desde então, muitos trabalhos passaram a investigar a aplicação de programas de exercício

na clínica oncológica. Além de melhorar o condicionamento físico e a qualidade de vida dos pacientes oncológicos, o exercício físico tem sido sugerido como uma importante terapia adjuvante (CORMIE; ZOPF; ZHANG; SCHMITZ, 2017). Em comparação a pacientes que praticam pouco ou nenhum exercício, aqueles que praticam exercício após o diagnóstico de câncer possuem uma menor mortalidade geral, menor risco de morte por câncer e de recorrência da doença.

Em 2002, a sociedade americana de câncer reconheceu os benefícios de uma vida fisicamente ativa na prevenção de diversos tipos de câncer (BYERS; NESTLE; MCTIERNAN; DOYLE *et al.*, 2002). Treze tipos de câncer já foram associados aos baixos níveis de atividade física (MOORE; LEE; WEIDERPASS; CAMPBELL *et al.*, 2016). Mas o volume de evidências da relação inversa entre níveis de exercício e incidência de tumores é mais robusto em mama e cólon (CHEN; WANG; ZHANG; XIE *et al.*, 2019; WCRF; AICR, 2018).

1.3.2 EXERCÍCIO FÍSICO E A PREVENÇÃO DO CÂNCER DE CÓLON

Tumores de cólon podem se formar na porção distal (colo descendente e sigmoide) ou na porção proximal (ceco, colo ascendente e transversal). Ambos apresentam etiologia, incidência geográfica e características moleculares e clínicas diferentes (IACOPETTA, 2002; LI, 2009). Tumores distais do cólon se assemelham molecularmente mais aos tumores no reto, com maior presença de instabilidade cromossômica e mutações em *APC* (*APC regulator of WNT signaling pathway*) e *TP53* (*tumor protein p53*). Tumores proximais são mais associados à instabilidade de microssatélite, mutações em *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene*) e um fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) (KIM; CASTRO; SHIM; ADVINCULA *et al.*, 2018).

Os tumores de cólon proximais são mais comuns em mulheres e são menos responsivos às terapias convencionais, por essa razão, são associados a pior sobrevida em comparação aos tumores distais (TEJPAR; STINTZING; CIARDIELLO; TABERNERO *et al.*; WONG, 2010). Curiosamente, apesar das diferenças entre os dois sítios, a prática de atividade física reduz o risco de forma equivalente tanto de tumores proximais (24-27%) quanto de distais (23-26%) (BOYLE; KEEGEL; BULL; HEYWORTH *et al.*, 2012; ROBSAHM; AAGNES; HJARTÅKER; LANGSETH *et al.*, 2013).

A associação entre atividade física e a redução de risco para câncer de cólon é a única associação de menor risco com nível de evidencia considerada convincente para esse câncer (CLINTON; GIOVANNUCCI; HURSTING, 2020). Esse efeito protetor ocorre de forma independente do índice de massa corporal (IMC), apesar do exercício também contribuir indiretamente para um menor risco de câncer de cólon através da redução da gordura corporal (MOORE; LEE; WEIDERPASS; CAMPBELL *et al.*, 2016). O risco de pessoas fisicamente ativas desenvolverem tumores de cólon se mostra 15-35% menor que em pessoas sedentárias em estudos de meta-análise (BALLARD-BARBASH; SCHATZKIN; ALBANES; SCHIFFMAN *et al.*, 1990; BOYLE; KEEGEL; BULL; HEYWORTH *et al.*, 2012; HARRISS; ATKINSON; BATTERHAM; GEORGE *et al.*, 2009; ROBSAHM; AAGNES; HJARTÅKER; LANGSETH *et al.*, 2013; WOLIN; YAN; COLDITZ; LEE, 2009). Diferentes contextos de atividade física parecem promover benefícios similares, dentre eles, atividades físicas ocupacionais (RR 0,74; 95% IC: 0,67 – 0,82), atividades recreativas (RR 0,80; 95% IC: 0,71 – 0,89), atividades por transporte/locomoção (RR 0,66; 95% IC: 0,45 – 0,98), atividades domésticas (RR 0,85; 95% IC: 0,71 – 1,02) (MAHMOOD; MACINNIS; ENGLISH; KARAHALIOS *et al.*, 2017). Curiosamente, esse mesmo trabalho identificou uma redução no risco de câncer de reto em atividades ocupacionais (RR 0,88; 95% IC: 0,79 – 0,98), recreativas (RR 0,87; 95% IC: 0,75 – 1,01) e por locomoção (RR 0,88; 95% IC: 0,75 – 1,01). Outra meta-análise mostrou um menor risco adquirido por atividades ocupacionais (RR 0,79; IC: 0,72 – 0,87) e recreativas (RR 0,79; IC: 0,72 – 0,87), mas nenhuma proteção em câncer de reto (SAMAD; TAYLOR; MARSHALL; CHAPMAN, 2005).

Uma dificuldade da epidemiologia é estabelecer se há diferença no efeito protetor do exercício entre modalidades mais específicas, como o exercício aeróbio contínuo, resistido ou anaeróbio intervalado de alta intensidade (HIIT, *High intensity interval training*). Boa parte da literatura associa os efeitos do exercício para saúde à modalidade aeróbia, principalmente por esta exigir uma maior demanda cardiorrespiratória, muscular e metabólica, além de induzir adaptações de caráter mais sistêmico no organismo (HAWLEY; HARGREAVES; JOYNER; ZIERATH, 2014). Nesse sentido, as diretrizes de exercício e câncer preconizam a prática de exercícios aeróbios acompanhados de exercícios

resistidos e de flexibilidade aos pacientes oncológicos (CAMPBELL; WINTERS-STONE; WISKEMANN; MAY *et al.*, 2019).

Outra lacuna é se há uma dose ideal de exercício necessária para se alcançar benefícios contra o câncer. São poucos os estudos que investigaram a relação de dose-resposta do exercício. Para se medir a intensidade de exercício, os estudos epidemiológicos utilizam a medida de Equivalente Metabólico da Tarefa (*MET*), que se refere ao quanto de energia é necessária para se executar certas atividades. Uma unidade da escala *METs* representa o consumo médio de oxigênio em repouso, ou seja 1 *MET* é igual a 3,5ml/kg/min (AINSWORTH; HASKELL; WHITT; IRWIN *et al.*, 2000). Logo, qualquer atividade além do repouso receberá uma escala de intensidade baseadas em *nMETs*. Por ser uma medida baseada em consumo de oxigênio, os resultados se associam mais ao componente aeróbio das atividades.

A redução do risco de câncer de cólon adquirido pelo exercício se mostra proporcional à duração e intensidade das atividades acumuladas na semana (CHAO, A.; CONNELL, C. J.; JACOBS, E. J.; MCCULLOUGH, M. L. *et al.*, 2004). Em comparação com indivíduos sedentários, homens e mulheres mais ativos apresentaram uma redução progressiva do risco de câncer de cólon (Figura 1.7). Nesse estudo, o acúmulo progressivo até 23 *METs/h/semana* se mantém proporcional a redução no risco de câncer. Outro estudo também mostrou uma relação proporcional entre maiores níveis de exercício e menor risco de câncer de cólon: 1,5-9,5 *METs/h/semana* (RR 0,88; CI: 0,79-0,98); 9,5-19 *METs/h/semana* (RR 0,81; CI: 0,70-0,92); ≥ 19 *METs/h/semana* (RR 0,79; CI: 0,70-0,89) (KYU; BACHMAN; ALEXANDER; MUMFORD *et al.*, 2016). Em uma coorte observacional prospectiva com mulheres diagnosticadas com câncer de cólon, aquelas que reportaram uma atividade física equivalente a 18 *METS/h* semana, apresentaram um risco de morte específica por câncer 57% menor (OR 0,43; 95%CI: 0,25-0,74) que seus pares sedentários (MEYERHARDT; HESELTINE; NIEDZWIECKI; HOLLIS *et al.*, 2006). Esse valor em *METs* representa cerca de duas vezes o recomendado para a saúde geral, proposto pelo *American College of Sport Medicine* (ACSM) (GARBER; BLISSMER; DESCHENES; FRANKLIN *et al.*, 2011).

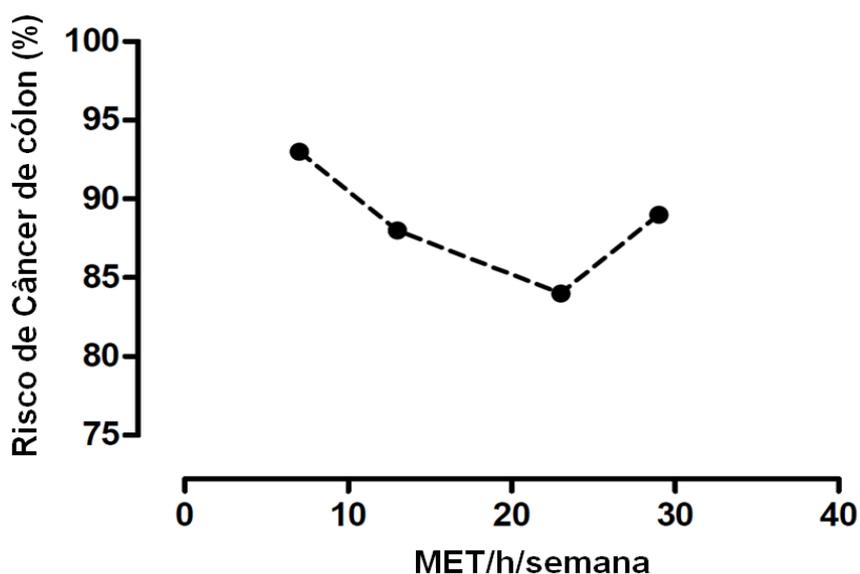


Figura 1.7: Risco de desenvolver câncer de cólon e o acúmulo semanal de MET/h. Fonte: Adaptado de (CHAO, ANN; CONNELL, CARI J; JACOBS, ERIC J; MCCULLOUGH, MARJORIE L *et al.*, 2004).

Além do efeito dose-resposta, não estão claros os mecanismos biológicos e o “timing” no qual o exercício desempenharia efeitos anti-tumorais (HOJMAN; GEHL; CHRISTENSEN; PEDERSEN, 2018). Os estudos pré-clínicos são uma ferramenta essencial para responder essas perguntas, possibilitando estudar mais detalhadamente o desenvolvimento de um tumor, testar possíveis intervenções terapêuticas e identificar seus mecanismos biológicos (MCINTYRE; BUCZACKI; ARENDS; ADAMS, 2015).

1.4 MODELOS QUÍMICOS DA CARCINOGENESE DE CÓLON

1.4.1 CARCINÓGENOS UTILIZADOS EM MODELOS QUÍMICOS

O modelo químico mais utilizado para a formação de tumores de cólon em roedores é a administração intraperitoneal seriada de azoximetano (AOM) (NEUFERT; BECKER; NEURATH, 2007). No passado, a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) era o carcinógeno mais utilizado para formação de tumores no cólon, porém com o tempo se concluiu que seu metabólito após oxidação, AOM, era um composto mais estável e produzia um efeito mais potente com uma dose menor, por isso passou a ser mais utilizado (FIALA; KULAKIS; BOBOTAS; WEISBURGER, 1976). O AOM possui um efeito químico indireto, colonotrópico e completo, atuando não só como iniciador da carcinogênese, mas também como promotor tumoral (NEUFERT; BECKER; NEURATH, 2007). Esse

carcinógeno é metabolizado no fígado pela CYP2E1 (*Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*) em metilazoximetanol (MAM) e chega ao intestino via ducto biliar e corrente sanguínea. No cólon, MAM sofre reações espontâneas liberando agentes alquilantes mutagênicos como o metildiazonium, que interagem com o tecido colônico desencadeando o processo de iniciação tumorigênica e na posterior mimetização das fases do desenvolvimento tumoral em humanos, desde a formação de focos de lesões pré-neoplásicas, passando por adenomas e por fim adenocarcinomas (Figura 1.8).

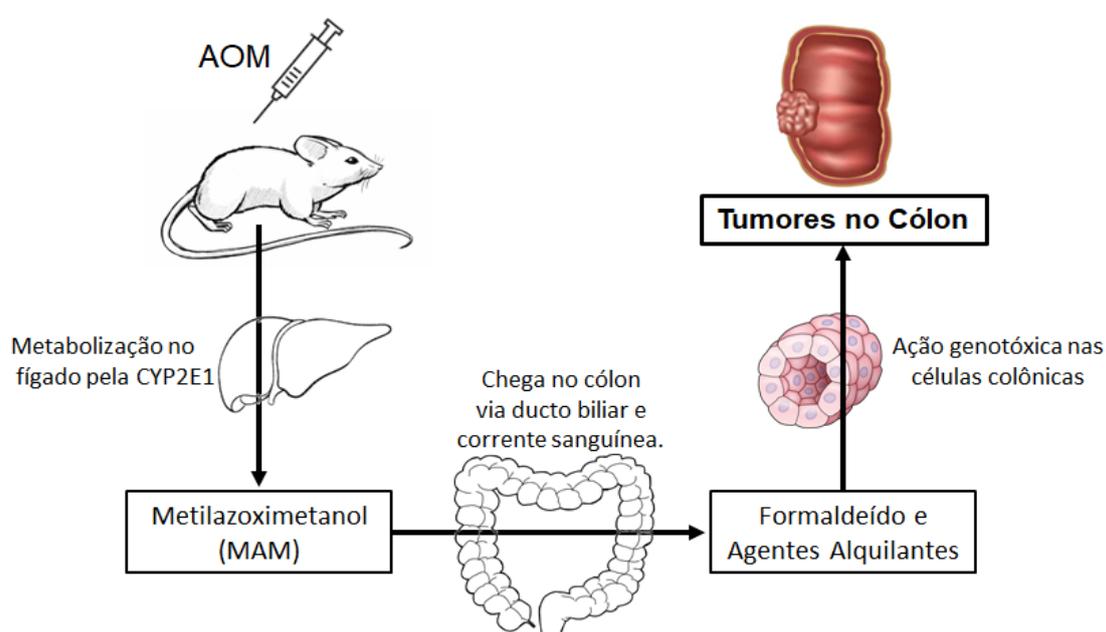


Figura 1.8: Mecanismo de indução de tumores no cólon pelo modelo químico com azoximetano (AOM); CYP2E1: Citocromo P450 2E1.

Dentre as lesões causadas no DNA pelos agentes alquilantes provenientes da metabolização do AOM, a mais genotóxica e pró-mutagênica é o aduto O⁶-metilguanina (O⁶MeG). Uma vez não reparada, o O⁶MeG pode levar a aberrações cromossômicas, quebra-dupla do DNA, morte celular e mutações, principalmente por *mismatch* das bases G:C para A:T (FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D., 2012; KAINA; CHRISTMANN; NAUMANN; ROOS, 2007). O acúmulo de O⁶MeG no cólon tem correlação positiva com a carga tumoral em modelos *in vivo* (JACKSON; O'CONNOR; COOPER; MARGISON *et al.*, 2003).

A O⁶meG é diretamente reparada pela *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), que retira o radical metil da guanina e se encaminha para

degradação junto ao radical removido (FANG; KANUGULA; PEGG, 2005). Esse sistema de reparo por MGMT previne a formação de mutações e reduz os efeitos genotóxicos tanto in vitro quanto in vivo (BECKER; GREGEL; FRICKE; KOMITOWSKI *et al.*, 2003; BUGNI; MEIRA; SAMSON, 2009; WIRTZ; NAGEL; ESHKIND; NEURATH *et al.*, 2010). No entanto, quando essa lesão não é reparada, a primeira replicação do DNA leva à formação do mal pareamento de G para A (FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D., 2012). O reparo da base alterada é feito pelas enzimas do reparo por *Mismatch* (MMR). Falhas nesse reparo podem desencadear a morte celular programada ou a perpetuação da mutação na célula, seja de forma direta ou através da formação de quebras duplas do DNA (Figura 1.9).

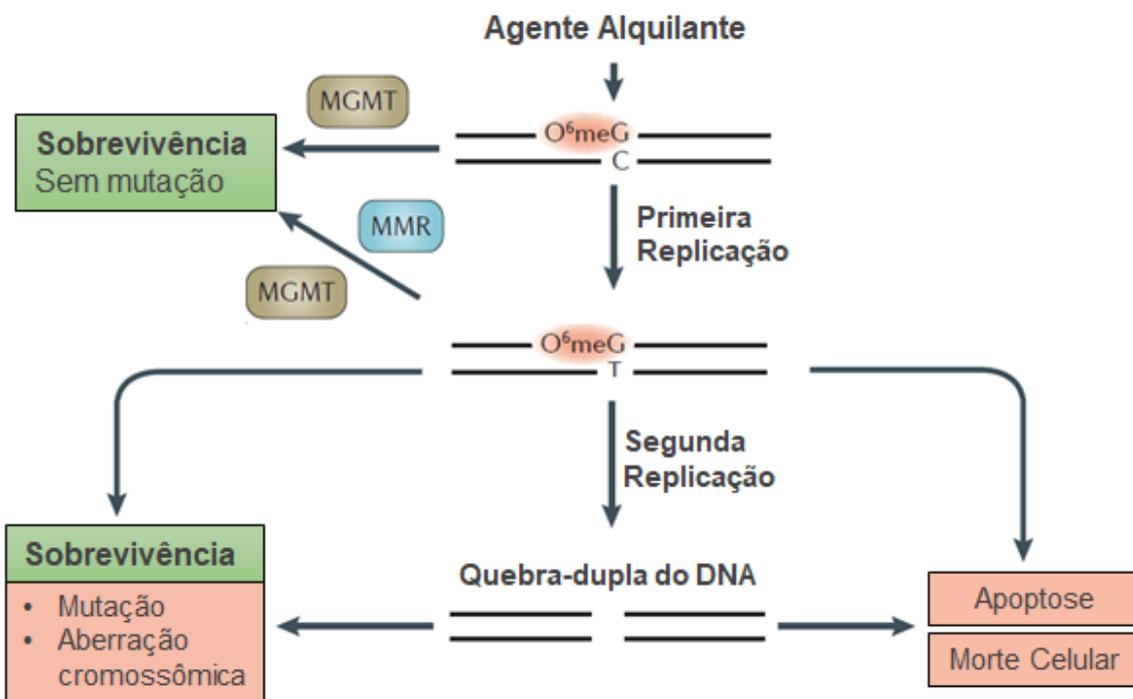


Figura 1.9: Processos celulares e reparo da lesão O⁶meG no DNA; O6-metilguanina (O6MeG); O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT); Reparo de Mismatch (MMR). Fonte: Adaptado de (FU, DRAGON; CALVO, JENNIFER A; SAMSON, LEONA D, 2012).

1.4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NO CÓLON EM MODELOS *IN VIVO*

O tecido colônico é formado por criptas com células epiteliais e células produtoras de mucina (células caliciformes). Esse muco protege o tecido das fezes e da microbiota intestinal (LEVINE; HAGGITT, 1989). Criptas displásicas no cólon são consideradas lesões pré-neoplásicas, ou seja, lesões precursoras

de tumor (CHEN; HUANG, 2009). Ao contrário da hiperplasia, a displasia não é uma alteração reversível. Sendo assim, uma vez displásica, a célula morre (por necrose ou apoptose) ou continua se multiplicando, formando focos displásicos, evoluindo eventualmente para um adenoma e por fim, um adenocarcinoma.

As criptas displásicas foram primeiramente descritas em 1987, recebendo a denominação de criptas aberrantes (CA), lesões histologicamente caracterizadas tanto em roedores tratados com carcinógenos quanto no desenvolvimento de tumores de cólon em humanos (BIRD, 1987; DI GREGORIO; LOSI; FANTE; MODICA *et al.*, 1997). Devido a displasia, as criptas perdem a diferenciação de suas células caliciformes e por isso apresentam uma perda gradual na produção de mucina. (FEMIA; CADERNI, 2008). Assim como as CA, as criptas com depleção de mucina (CDM) também são utilizadas como marcador histológico de lesões pré-neoplásica em modelos de carcinogênese química *in vivo* (YOSHIMI; MORIOKA; KINJO; INAMINE *et al.*, 2004).

A análise da formação dessas lesões em estudos pré-clínicos é essencial no teste de intervenções terapêuticas e preventivas contra o câncer de cólon (NEUFERT; BECKER; NEURATH, 2007). Modelos de carcinogênese induzida em roedores baseados na aplicação do carcinógeno AOM são consolidados e validados na premeditação da eficácia de intervenções preventivas para humanos (CORPET; PIERRE, 2005).

1.5 PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO EM MODELOS DE CARCINOGENESE *IN VIVO*

Desde a década de 80 estudos *in vivo* utilizando AOM ou DMH demonstraram uma menor incidência e multiplicidade de tumores no cólon nos animais que praticaram exercício voluntário em comparação aos sedentários (ANDRIANOPOULOS; NELSON; BOMBECK; SOUZA, 1987). Após o tratamento com AOM e trinta e oito semanas de exercício voluntário, a incidência de adenocarcinomas no cólon foi 36,5% menor e a multiplicidade 28,2% menor nos animais expostos ao exercício comparados aos controles sedentários (REDDY; SUGIE; LOWENFELS, 1988).

Posteriormente, outros estudos demonstraram esse mesmo efeito protetor utilizando protocolos de exercício planejado (exercício programado, não-voluntário). Após o tratamento com AOM, 25% dos ratos submetidos a um

protocolo de corrida em esteira apresentaram tumores no cólon, comparado a taxa de incidência de 44% no grupo sedentário. (THORLING; JACOBSEN; OVERVAD, 1993). Esse mesmo efeito foi observado em 6 semanas de protocolo de corrida, reduzindo a multiplicidade de lesões pré-neoplásicas únicas em 50% e de focos de lesões em 63% em comparação ao grupo sedentário (AOI; NAITO; TAKAGI; KOKURA *et al.*, 2010). Outro estudo, utilizando tratamento com DMH e aplicando também um protocolo induzido de corrida, mostrou que os animais exercitados desenvolveram em média metade das lesões neoplásicas do grupo sedentários (Grupo Exercício, 40 lesões únicas e 14 focos *versus* grupo Sedentário, 80 lesões únicas e 27 focos de lesão) (FUKU; OCHIAI; TERADA; FUJIMOTO *et al.*, 2007). Protocolos de natação também obtiveram um efeito antagônico a carcinogênese no cólon. Vinte e três semanas do protocolo de natação induziram uma menor incidência e multiplicidade de tumores do cólon por tratamento com DMH (PERŠE; INJAC; ŠTRUKELJ; CERAR, 2012). Tal como 8 semanas de natação promoveram menor incidência e multiplicidade de lesões pré-neoplásicas no cólon (FERNANDES; MARINI; FRAJACOMO; JORDAO *et al.*, 2015). Contudo, a interpretação da dose e as perspectivas translacionais diferem entre os tipos de treino utilizados. O exercício voluntário permite o acesso livre ao aparato de exercício de acordo com o comportamento do animal. Esse caráter espontâneo de movimento sem padrões definidos das variáveis de intensidade, duração ou frequência dificultam a interpretação da dose de exercício. Por outro lado, modelos induzidos permitem um controle preciso da “dose” de exercício como intensidade, duração, volume e frequência, sendo o que mais se adequam as perspectivas em estudos translacionais.

Analisando os trabalhos *in vivo* já realizados de exercício e modelos químicos de carcinogênese, é possível identificar uma grande heterogeneidade metodológica entre eles. Dessa forma, observamos diferentes *timings* de aplicação de exercício com predomínio de protocolos aplicados durante e/ou após a aplicação do carcinógeno, obtendo um efeito anti-tumoral similar sob lesões e tumores no cólon (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Estudos com impacto do exercício físico sobre a tumorigênese do cólon induzida por modelos químicos.

Referência	Animais	Modelo químico	Modelo de exercício	Resultados
{Adrianopoulos, 1987}	Ratos <i>Sprague-Dawley</i>	6x(DMH;20mg/kg)	Voluntário (6 semanas) *	↓ Incidência de tumores
{Reddy, 1988}	Ratos F344	2x(AOM;15mg/kg)	Voluntário (38 semanas) **	↓ Incidência e multiplicidade de tumores
{Thorling, 1993}	Ratos <i>Fischer</i>	3x(AOM;15mg/kg)	Protocolo de corrida em esteira (38 semanas) **	↓ Incidência de tumores
{Fuku, 2007}	Ratos F344	2x(DMH;20mg/kg)	Protocolo de corrida em esteira (4 semanas) **	↓ Multiplicidade de CA e FCA
{Lunz, 2008}	Ratos <i>Wistar</i>	4x(DMH;40mg/kg)	Protocolo de natação (35 semanas) **	↓ Multiplicidade de CA e FCA
{Aoi, 2010}	Camundongos Balb/c	2x(AOM;12,5mg/kg)	Protocolo de corrida em esteira (6 semanas) ***	↓ Multiplicidade de CA e FCA
{Perse, 2012}	Ratos <i>Wistar</i>	15x(DMH;20mg/kg)	Protocolo de natação (23 semanas) †*	↓ Incidência e multiplicidade de tumores
{Aoi, 2013}	Camundongos ICR	2x(AOM;12,5mg/kg)	Protocolo de corrida em esteira (6 semanas) ***	↓ Multiplicidade de CA e FCA
{Fernandes, 2015}	Ratos <i>Wistar</i>	1x(DMH;125mg/kg)	Protocolo de natação (8 semanas) **	↓ Multiplicidade de FCA
{Frajacomo, 2015}	Camundongos Balb/c	4x(MNNG;5mg/ml)	Protocolo de natação (8 semanas) ***	↓ Multiplicidade de CA
{Kelly, 2017}	Camundongos A/J e CC0001/Unc	5x(AOM;10mg/kg)	Voluntário (5 semanas) † *	↓ Multiplicidade de tumores

AOM: Azoximetano; DMH: Dimetilhidrazina; MNNG: Metilnitrosolamida; CA: Criptas aberrantes; FCA: Foco de criptas aberrantes; †Exercício prévio ao modelo químico; †*Exercício realizado antes e durante o modelo químico; *Exercício realizado durante o modelo químico; **Exercício realizado após ao modelo químico; ***Exercício realizado durante e após ao modelo químico.

1.6 MECANISMOS ANTI-TUMORAIS DO EXERCÍCIO

Os estudos pré-clínicos mostram que o exercício tende a se opor ao desenvolvimento do câncer em todas as suas fases, reduzindo a incidência e multiplicidade de lesões em modelos químicos ou inibindo o crescimento em modelos de transplante tumoral (BETOF; LASCOLA; WEITZEL; LANDON *et al.*, 2015; HOJMAN; GEHL; CHRISTENSEN; PEDERSEN, 2018; PEDERSEN;

IDORN; OLOFSSON; LAUENBORG *et al.*, 2016). Apesar das evidências do efeito preventivo do exercício no câncer serem mais robustas, estudos clínicos e epidemiológicos mostram um efeito benéfico do exercício, realizado pós-diagnóstico, sobre a sobrevivência de pacientes de diferentes tipos de câncer (MCTIERNAN; FRIEDENREICH; KATZMARZYK; POWELL *et al.*, 2019). Isso reforça a hipótese que o exercício atua não só na prevenção primária do câncer, mas também nas demais fases da doença.

Em estudos pré-clínicos, o controle do exercício sobre a taxa de crescimento tumoral varia de 31-67% do seu volume (HOJMAN; GEHL; CHRISTENSEN; PEDERSEN, 2018). Entretanto, o exercício sozinho não consegue erradicar por completo o crescimento de tumores e poucos trabalhos mostram um impacto sobre a formação de metástases (ASHCRAFT; PEACE; BETOF; DEWHIRST *et al.*, 2016; ROGERS; COLBERT; GREINER; PERKINS *et al.*, 2008). O efeito do exercício no câncer se mostra multifatorial, abrangendo diversos dos *hallmarks* do câncer (RUIZ-CASADO; MARTÍN-RUIZ; PÉREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017). Estudos experimentais destacaram que o exercício regular pode inibir o crescimento do tumor, por meio de alterações no sistema imunológico, no metabolismo, pela modulação de hormônios, na angiogênese e na inflamação sistêmica (ASSI; DUFRESNE; RÉBILLARD, 2020).

Em um modelo murino de inoculação tumoral, a exposição ao exercício voluntário resultou no aumento da citotoxicidade imunológica contra as células tumorais de pulmão de Lewis e melanoma (PEDERSEN; IDORN; OLOFSSON; LAUENBORG *et al.*, 2016). Neste trabalho o exercício promoveu uma maior mobilização de células *Natural Killers* (NK) para o sítio tumoral por meio da atuação de adrenalina e da miocina IL-6 (*Interleukin 6*), o que resultou na supressão do crescimento tumoral. Em outro estudo, o exercício promoveu uma profunda organização e maturação da rede vascular tumoral em um modelo singênico e ortotópico de células tumorais mamárias (BETOF; LASCOLA; WEITZEL; LANDON *et al.*, 2015). Como consequência, houve uma redução das áreas de hipóxia tumoral nos grupos exercitados, acompanhada da redução do volume do tumor em comparação aos animais sedentários. Nesse mesmo estudo, quando conjugado com quimioterapia, o exercício aumentou a sensibilidade do tumor ao tratamento, promovendo redução ainda maior do volume tumoral. Outra teoria da efeito anti-tumoral do exercício vem da atuação

endócrina do músculo esquelético. Algumas interleucinas liberadas pelo músculo esquelético durante a contração muscular, conhecidas como miocinas, vem demonstrando efeitos anti-tumorigênicos. Dentre elas, a oncostatina M reduzindo o crescimento de células de câncer de mama hormônio-sensíveis (HOJMAN; DETHLEFSEN; BRANDT; HANSEN *et al.*, 2011) e a SPARC (*Secreted protein acidic and cysteine rich*) induzindo menor formação de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos expostos ao AOM (AOI; NAITO; TAKAGI; TANIMURA *et al.*, 2013).

Além desses mecanismos anti-tumorais do exercício, outros possíveis mecanismos precisam ser melhor descritos, especialmente em modelos de carcinogênese como: quebra da homeostase redox, metabólica tumoral e indução de estresse energético (ASSI; DUFRESNE; RÉBILLARD, 2020; HOFMANN, 2018; JIANG; ZHU; THOMPSON, 2013); antagonismo às vias pró-tumorais de proliferação e apoptose (YU; KING; EWERT; SU *et al.*, 2016); regulação de vias pró-inflamatórias (BILSKI; MAZUR-BIALY; BRZOZOWSKI; MAGIEROWSKI *et al.*, 2016; HOFFMAN-GOETZ; PERVAIZ; PACKER; GUAN, 2010).

Muitos desses trabalhos pré-clínicos se voltam para os efeitos do exercício sobre tumores já estabelecidos, abrangendo fases avançadas de promoção e progressão. Enquanto isso, sabe-se muito pouco como o exercício prévio interage com processos iniciais da carcinogênese (HOJMAN; GEHL; CHRISTENSEN; PEDERSEN, 2018).

Existe a hipótese que a prática regular de exercício confere aos tecidos uma maior resistência contra insultos genotóxicos presentes no ambiente ou adquiridos intrinsecamente por hábitos de vida (ROGERS; COLBERT; GREINER; PERKINS *et al.*, 2008). Essa resistência seria fruto de uma maior eficiência em sistemas metabólicos, de redox e de reparo do DNA, prevenindo assim o “*turnover*” de um tecido normal para um tecido “iniciado” à carcinogênese. Nessa linha, alguns estudos demonstram uma regulação do exercício a longo prazo sobre a atividade de enzimas antioxidantes (UDP-glucuronosiltransferase e DT-diaforases) em diferentes tecidos, como músculo esquelético, pulmão e fígado de roedores (DUNCAN; HARRIS; ARDIES, 1997; RADÁK; KANEKO; TAHARA; NAKAMOTO *et al.*, 1999). Um protocolo de natação de dez semanas promoveu a inibição de cerca de 50% do crescimento

de células tumorais de leucemia em camundongos (RADAK; GAAL; TAYLOR; KANEKO *et al.*, 2002). Esse efeito se deu junto a menores níveis de derivados reativos de carbonila nos tumores em animais treinados, indicando uma possível relação entre o efeito observado e a menor produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS). Em leucócitos humanos, os níveis de dano oxidativo por 8-OH-dG (*8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*) ao DNA se encontram menores em homens fisicamente ativos em comparação aos pares sedentários (ASAMI; HIRANO; YAMAGUCHI; ITOH *et al.*, 1998). Tal fenômeno se mostrou correlacionado com a maior expressão gênica da enzima de reparo *MLH1* (*mutL homolog 1*), também em leucócitos de homens fisicamente ativos (SATO; NANRI; OHTA; KASAI *et al.*, 2003). Altos níveis intracelulares de RONS comprometem os mecanismos de reparo de DNA, tornando possível que efeitos antioxidantes provenientes do exercício desempenhem um papel anti-carcinogênico (ASSI; DUFRESNE; RÉBILLARD, 2020; FENG; HU; TANG, 2004).

Esses dados sugerem um efeito sistêmico e multifatorial do exercício que altera a homeostase celular em favor de uma maior adaptação contra insultos alquilantes e oxidativos ao DNA. Contudo, ainda não se sabe se esse efeito do exercício promoveria uma resposta anti-carcinogênica mais eficiente dos tecidos frente à insultos genotóxicos.

1.7 PAPEL DA EPIGENÉTICA NOS MECANISMOS ANTI-TUMORAIS DO EXERCÍCIO

Diferente das alterações genéticas, a epigenética engloba mecanismos que alteram a expressão de genes sem provocar alterações nas bases do *DNA* (CAMUZI; DE AMORIM; RIBEIRO PINTO; OLIVEIRA TRIVILIN *et al.*, 2019). As alterações epigenéticas são herdáveis e dentre elas temos as modificações das histonas, os *RNAs* não-codificantes e a metilação do *DNA* (Figura 1.10). Modificações nas caudas das histonas (proteínas nas quais se enovela o *DNA*) mudam sua conformação, aumentando ou diminuindo a exposição de regiões do *DNA*, alterando assim sua transcrição. Os *RNAs* não-codificantes reprimem a expressão gênica de maneira pós-transcricional, pois são capazes de encaminhar *mRNAs* para degradação. A metilação da guanina em sítios CpG é a modificação epigenética mais estudada. A hipermetilação de regiões

promotoras está geralmente associada a repressão da expressão gênica, enquanto a hipometilação dessas regiões está associada a maior expressão. No corpo do gene essa relação parece se inverter. Além disso, foi demonstrado que a hipometilação global do *DNA* promove instabilidade cromossomal, auxiliando mecanismos pró-tumorais (SUTER; MARTIN; WARD, 2004).

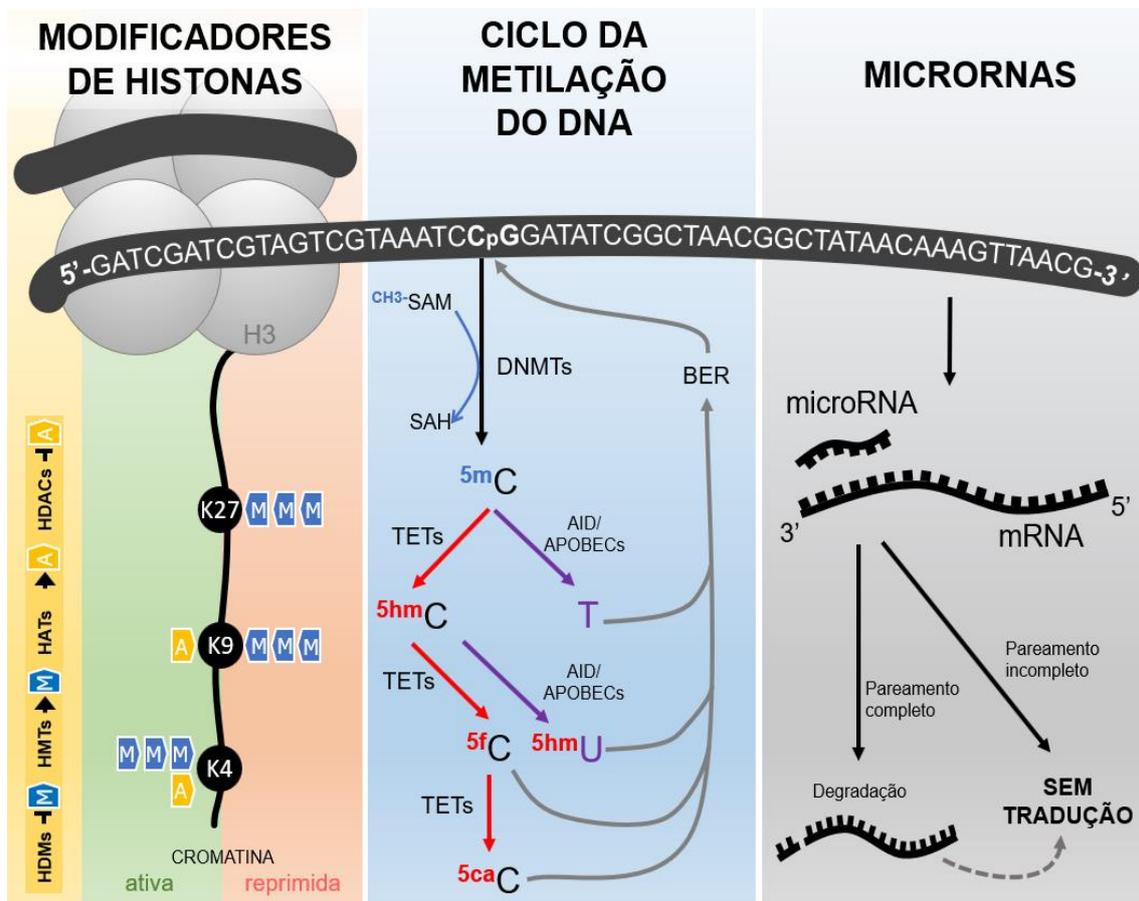


Figura 1.10: Mecanismos epigenéticos por modificação de histonas, metilação do DNA e atuação de RNAs não codificantes; **SAM** (*S-Adenosyl methionine*); **HDM** (*Histone demethylase*); **HDAC** (*Histone deacetylase*); **SAH** (*S-Adenosyl-L-homocysteine*); **5hmC** (*5-Hydroxymethylcytosine*); **5fC** (*5-Formylcytosine*); **5caC** (*5-carboxylcytosine*); **5hmU** (*5-hydroxymethyluracil*); **TET** (*Ten-eleven translocation*); **AID** (*Activity-induced cytidine deaminase*); **APOBEC** (*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme*); **DNMT** (*DNA methyltransferase*); **mRNA** (RNA mensageiro). Fonte: Adaptado de (CAMUZI; DE AMORIM; RIBEIRO PINTO; OLIVEIRA TRIVILIN *et al.*, 2019).

Está claro na literatura que fatores ambientais tem um grande impacto sobre a epigenética, sendo responsiva a fatores ligados ao estilo de vida como dieta, exercício físico, *stress*, entre outros (JACQUES; HIAM; CRAIG; BARRÈS *et al.*, 2019). A relação entre exercício e epigenética tem sido elucidada principalmente no músculo esquelético. Alterações na expressão gênica em

resposta às adaptações fisiológicas do exercício se mostram orquestradas por uma profunda modulação epigenética (JACQUES; HIAM; CRAIG; BARRÈS *et al.*, 2019).

Estudos em animais e em humanos demonstraram uma regulação epigenética por meio do exercício em outros tecidos além do músculo. Por exemplo, em roedores, o exercício voluntário promoveu a queda da atividade de histonas desacetilases e um maior nível de acetilação de histonas 3 em células do hipocampo e cerebelo, promovendo nessas regiões alterações em genes envolvidos na neuroplasticidade (ABEL; RISSMAN, 2013; GOMEZ-PINILLA; ZHUANG; FENG; YING *et al.*, 2011). Em pacientes de linfoma não-*hodgkins*, um protocolo de exercício aeróbio em cicloergômetro induziu a acetilação de histonas em células NK e CD8, resultando na maior atividade dessas células (ZIMMER; BAUMANN; BLOCH; SCHENK *et al.*, 2014). Dessa forma, as evidências reforçam a possibilidade de muitos dos efeitos sistêmicos do exercício serem orquestrados por mecanismos epigenéticos, ocorrendo não só em tecidos metabolicamente ativos como o músculo esquelético, mas também em outros.

Contudo, dentro da pesquisa oncológica, a área de exercício e epigenética ainda é pouco explorada. Um estudo clínico-randomizado com exercício aeróbio em pacientes de câncer de mama, associou a prática de exercício com alterações na metilação de 43 genes em leucócitos, dentre elas, a redução da metilação do supressor tumoral *L3MBTL1* (*lethal 3 malignant brain tumor-like 1*) (ZENG; IRWIN; LU; RISCH *et al.*, 2012), que em amostras de pacientes, sua maior expressão no tumor foi associada a maior sobrevida geral e sobrevida livre de recorrência. Um estudo transversal observou, em células da mama de mulheres sem câncer, uma correlação inversa entre histórico de atividade física e hipermetilação dos promotores dos genes *APC* e *RASSF1A* (*Ras Association Domain Family Member 1*), genes supressores de tumor com hipermetilação associada a risco de câncer de mama (COYLE; XIE; LEWIS; BU *et al.*, 2007).

Por apresentar um comportamento dinâmico e responsivo aos hábitos de vida, a epigenética pode estar envolvida nos mecanismos anti-tumorais do exercício, principalmente nas fases iniciais da carcinogênese. Porém, esse papel ainda não foi investigado. Até o momento, não há estudos pré-clínicos que

investigaram a relação entre exercício físico e epigenética em modelos de carcinogênese

1.8 JUSTIFICATIVA

Grande parte dos estudos pré-clínicos que investigam os mecanismos biológicos do exercício se concentram em fases de promoção-progressão tumoral, enquanto pouco se sabe da interação do exercício com mecanismos de iniciação (KOELWYN; QUAIL; ZHANG; WHITE *et al.*, 2017; RUIZ-CASADO; MARTÍN-RUIZ; PÉREZ; PROVENCIO *et al.*, 2017). Salientando as evidências em humanos de que o exercício previne o desenvolvimento de até treze tipos de câncer (MOORE; LEE; WEIDERPASS; CAMPBELL *et al.*, 2016), um olhar para os mecanismos de iniciação tumoral parece ser o caminho para a compreensão biológica de como esse efeito protetor ocorre em fases de prevenção primária.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar os efeitos do exercício sobre mecanismos da fase de iniciação tumoral e da subsequente formação de lesões pré-neoplásicas no cólon pela exposição ao azoximetano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a incidência e multiplicidade de lesões pré-neoplásicas no cólon dos animais tratados cronicamente com AOM.
- Avaliar o efeito do exercício sobre formação de dano ao DNA no cólon dos animais expostos a uma dose de AOM.
- Avaliar a efeito do exercício sobre a expressão gênica de enzimas de reparo do DNA nos animais expostos a uma dose de AOM.
- Avaliar a ação do exercício sobre a metilação do DNA no cólon nos animais expostos a uma dose de AOM.
- Avaliar a ação do exercício sobre a expressão gênica de enzimas da maquinaria epigenética no cólon dos animais expostos a uma dose de AOM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÉTICA E ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (documento 001/16).

Setenta camundongos da linhagem C57/BL6, machos adultos (8 semanas de vida no início do experimento) nascidos e criados no biotério de criação do CPQ-INCA (Centro de Pesquisa do INCA) foram utilizados para os experimentos I (AOM Crônico) e II (AOM Agudo). Os animais foram alocados em mini isoladores (cinco animais cada) em uma sala climatizada com temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 45-60% e ciclo de dia-noite de 12-12 horas, onde receberam uma dieta padrão para camundongos e hidratados com água de torneira auto-clavada *ad libitum*.

O carcinógeno Azoximetano foi preparado em solução *stock* na concentração de 10mg/mL em solução PBS estéril. A solução trabalho foi preparada no dia da aplicação com ajuste de dose para 10mg/kg/animal. A aplicação do AOM ocorreu via intra-peritoneal por uma seringa de insulina com agulha 25G. Ao final do experimento os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (5:1; via *i.p*) e eutanasiados por inalação de CO₂ seguida de exsanguinação induzida por punção cardíaca (VAN VLIET; CHAFE; MONTANI, 2003).

3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO

Os animais realizaram o protocolo de natação em uma caixa de polietileno com capacidade de 36 litros (dimensões de 21 x 39 x 60 cm) preenchida com água ($32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) até 50 cm de altura. No protocolo de natação, adaptado de Frajacomo et al. (2015), com cinco sessões/semana com duração total de seis semanas de treino (FRAJACOMO; KANNEN; DEMINICE; GERALDINO *et al.*, 2015). A primeira semana foi dedicada a adaptação dos animais ao ambiente aquático (progressão diária da profundidade da água e do tempo) e as demais ao treinamento com intensidade progressiva (por meio do aumento da duração das sessões ou implementação de carga) como mostra a figura 3.1.

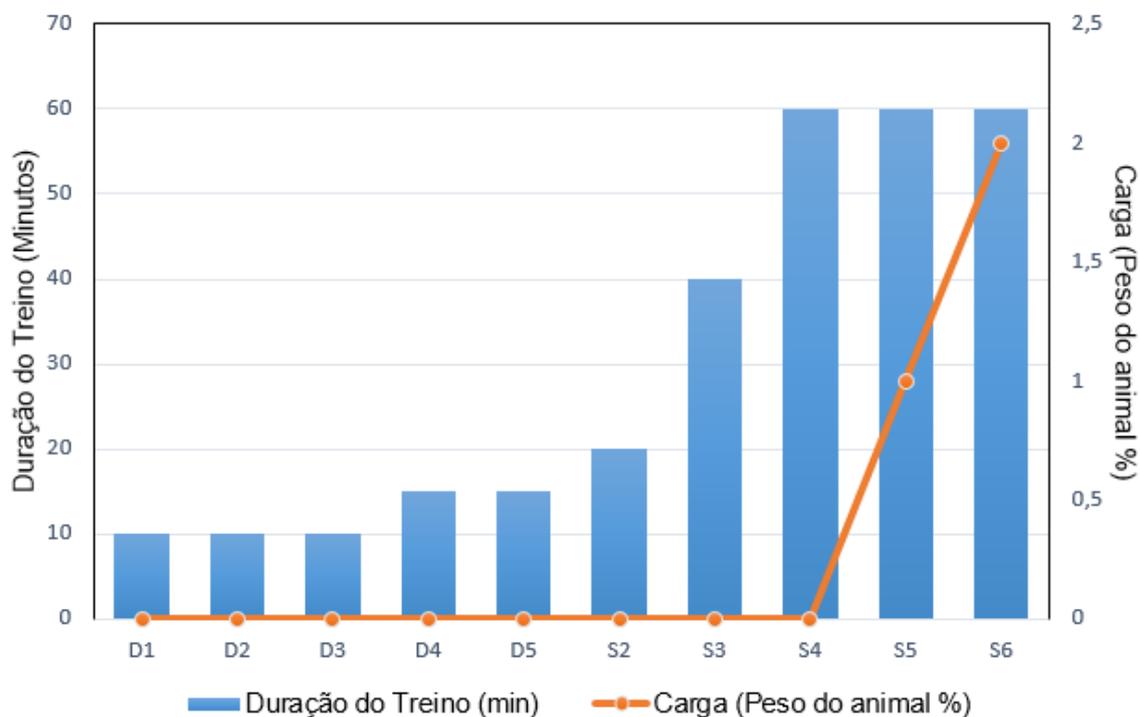


Figura 3.1: Protocolo de natação. Coluna azul (eixo X): Duração do treinamento (minutos); Linha laranja (eixo Z): Carga (% do peso total do animal); Eixo Y: Tempo decorrido no protocolo (D = dias; S = semanas).

3.3 EXPERIMENTO I – AOM CRÔNICO

Trinta camundongos foram divididos em três grupos (Figura 3.2). As doses crônicas de AOM foram aplicadas uma vez na semana por seis semanas. O protocolo de natação com duração de seis semanas foi realizado em dois momentos, previamente ao tratamento com AOM ou de forma concomitante a este.

Duas semanas após a última aplicação de AOM os animais foram eutanasiados e foi feita a pesagem da gordura epididimal e do coração. O cólon do animal foi retirado, cortado transversalmente na borda do ceco e aberto pela sua borda mesentérica. A parte distal foi dividida transversalmente e separada em três segmentos. Dois terços foram fixados em formalina 10% por 24h, em seguida foram tratados com azul de metileno para a identificação de regiões de interesse com possíveis lesões neoplásicas e submetidos ao processo rotineiro de inclusão em parafina para análises histológicas, enquanto um terço foi armazenada em nitrogênio e encaminhado para extração de RNA e DNA para análises moleculares (MCGINLEY; THOMPSON; THOMPSON, 2010). O peso

corporal total, do coração e da gordura epididimal foram aferidos como medida indireta da atuação do exercício e do tratamento no organismo.

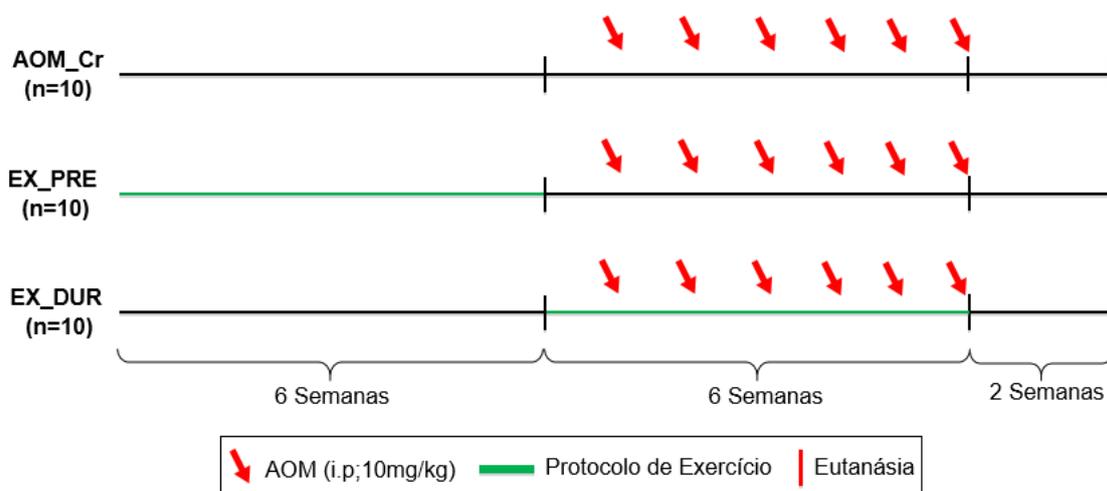


Figura 3.2: Grupos do Experimento I. Tratamento crônico de azoximetano, sem exercício (AOM_CR); Exercício prévio ao tratamento crônico de azoximetano (EX_PRE); Exercício concomitante ao Tratamento crônico de azoximetano (EX_DUR). Duas semanas após a última dose de azoximetano todos os grupos foram eutanasiados.

3.3.1 HISTOLOGIA

Blocos parafinados com o tecido do cólon foram cortados transversalmente à superfície da mucosa em 4µm de espessura e posteriormente montados em lâminas. Para a identificação de lesões pré-neoplásicas, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) ou com *alcian blue* para a identificação de criptas aberrantes (CA) e criptas com depleção de mucina (CDM), respectivamente (CADERNI; FEMIA; GIANNINI; FAVUZZA *et al.*, 2003; PAULSEN; LØBERG; ØLSTØRN; KNUTSEN *et al.*, 2005).

Por apresentar caráter básico, a hematoxilina possui atração por componentes ácidos, como os ácidos nucleicos, por essa razão é utilizada na coloração de núcleos celulares. Por outro lado, a eosina, sendo ácida, possui afinidade pelos demais componentes citoplasmáticos. A coloração com H&E permite a identificação de lesões displásicas por meio de alterações estruturais e morfológicas das criptas intestinais.

O *alcian blue* é utilizado na coloração de mucopolissacarídeos, neste caso especificamente na marcação da mucina produzidas pelas células

caliciformes das criptas intestinais, permitindo a observação da redução da produção de muco proveniente da perda de diferenciação celular.

As análises histológicas foram realizadas no microscópio de luz (*BX53, Olympus Corporation, Tokyo, Japão*) e as imagens foram tiradas por uma câmera digital acoplada ao microscópio (*DP72, Olympus Corporation, Tokyo, Japão*) e enviadas ao computador pelo programa *Image-Pro® Express* versão 6.3 para Windows TM (*Media Cybernetics, Inc.*).

A identificação de CA foi realizada de acordo com os critérios de displasia estabelecidos previamente (BIRD, 1987; PAULSEN; LØBERG; ØLSTØRN; KNUTSEN *et al.*, 2005). Dentre eles, núcleo alongado ou aumentado; pseudoestratificação ou perda de polaridade nuclear; redução ou ausência de células caliciforme; espessamento da camada epitelial; distorção em fenda do lúmen criptal.

A identificação de CDM seguiu a definição descrita previamente (CADERNI; FEMIA; GIANNINI; FAVUZZA *et al.*, 2003). A cripta foi considerada com depleção de mucina mediante a perda total ou parcial (>50%) da área mucinosa.

A aglomeração de duas ou mais CA ou CDM eram considerados focos de criptas aberrantes (FCA) e focos com depleção de mucina (FDM), respectivamente (BIRD, 1987; CADERNI; FEMIA; GIANNINI; FAVUZZA *et al.*, 2003).

A contagem foi realizada de forma cega e por dois avaliadores, de forma que o escore final das lesões pré-neoplásicas foi a média da contagem dos dois avaliadores. Foram avaliadas a incidência (número de animais que desenvolveram lesões) e a multiplicidade de lesões no cólon (média de lesões formadas por animal).

3.3.2 SEQUENCIAMENTO DO DNA

A técnica de sequenciamento nos permite analisar a sequência de nucleotídeos de uma região de interesse no DNA graças a reação de síntese de DNA mediada pela DNA Polimerase, onde cada base do DNA é associada a uma marcação de fluorescência diferente. Dessa forma o sequenciador nos fornece a sequência do transcrito previamente amplificado.

No *DNA* extraído (item 3.4.2), regiões dos genes *KRAS* e *β-Catenina* foram amplificados por *PCR* convencional nas seguintes condições: 2,5µL de *10X Buffer* (Invitrogen), 0,75µL *MgCl₂* 50mM (Invitrogen), 0,5µL de *dNTP* 10mM, 0,5µL de *primer* senso e 0,5µL de *primer* anti-senso (Tabela 3.1), 0,1µL da enzima *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 19,15µL de água deionizada auto-clavada e 1µL da amostra de *DNA*; ***KRAS***. (1x [94°C por 2 minutos]; 35x [94°C por 30 segundos + 55°C por 30 segundos + 72°C por 30 segundos]; 1x [72°C por 5 minutos]); ***β-Catenina***. (1x [94°C por 2 minutos]; 35x [94°C por 30 segundos + 60°C por 30 segundos + 72°C por 30 segundos]; 1x [72°C por 5 minutos]).

Tabela 3.1: Sequências dos primers utilizados na amplificação para o sequenciamento.

Genes	Sequências dos primers (5'-3')
KRAS	Senso: GGCCTGCTGAAAATGACTGA Anti-senso: GACTTGGGAGGTGTCAACAT
β-Catenina	Senso: CATGGAGCCGGACAGAAAAG Anti-senso: GACTTGGGAGGTGTCAACAT

O produto de *PCR* foi purificado com o *PureLink® PCR Purification Kit* (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante: Colocar *Spin columns* nos tubos coletores; Adicionar 200µL de *Binding Buffer B2* em 50µL de *DNA*; Centrifugar a 10.000g por 1 minuto; Descarte o líquido no tubo coletor; adicione 600µL de *Wash Buffer W1*; Centrifugar a 10.000g por 1 minuto; Descarte o líquido no tubo coletor; Centrifugar a máxima velocidade por 2-3 minutos; Colocar o *Spin column* em um *Elution Tube*; adicionar 50µL de *Elution Buffer* no centro do *Spin column* e incubar em temperatura ambiente por 1 minuto; Centrifugar a máxima velocidade por 2 minutos; armazenar *DNA* purificado no *Elution Tube* em -20°C.

Em seguida, o *DNA* amplificado e purificado foi pipetado em uma placa para a reação de sequenciamento, no qual cada amostra era pipetada em 4 poços, dois com *primer* senso e dois com o anti-senso. A reação de sequenciamento foi realizada no termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 4µL de amostra de *DNA* (diluído em

0,75ng/ μ L), 1 μ L de *BigDye[®] Terminator* (Applied Biosystems), 1,5 μ L de *5X Sequencing Buffer* (Applied Biosystems) e 3,5 μ L de primer senso ou anti-senso (Tabela 3) (1x [96°C por 1 minuto]; 40x [96°C por 15 segundos + 50°C por 15 segundos + 60°C por 4 minuto]).

Após a reação do sequenciamento a placa deve passar por uma etapa de precipitação, nesta o material amplificado forma um pellet no fundo da placa e os demais produtos são descartados. A precipitação da reação foi realizado nas seguintes etapas: Centrifugar com fita de vedação (600 rpm por 1 minuto; 4°C); adicionar 30 μ L de isopropanol 75%; ressuspender as amostras (movimentos circulares rápidos sobre a bancada); incubar a placa à 4°C por 15 minutos a abrigo da luz; centrifugar com fita de vedação (4.000 rpm por 45 minuto; 4°C); descartar sobrenadante (vertendo a placa sobre camadas de papel-toalha, realizando movimentos circulares rápidos sobre a bancada); centrifugar com placa aberta e invertida sobre papel toalha (600rpm por 1 minuto; 4°C); adicionar 50 μ L de etanol 75%; centrifugar com fita de vedação (4.000 rpm por 15 minutos; 4°C); Descartar sobrenadante novamente como descrito; centrifugar com placa aberta e invertida sobre papel toalha (600rpm por 1 minuto; 4°C); Encaminhar ao termociclador para secagem com placa aberta (60°C por 10 minutos; 4°C). Por fim, a análise do sequenciamento foi realizada pelo *Hitachi 3130xl Genetic Analyzer DNA Sequencer 628-0040* (Applied Biosystems).

3.4 EXPERIMENTO II – AOM AGUDO

Quarenta camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais (Figura 3.3). Após as seis semanas de exercício ou controle, os animais foram expostos a dose única de AOM (10mg/kg, *i.p*) ou veículo (soro fisiológico), sendo eutanasiados em 8 ou 24hs após o AOM, conforme figura 3.3. Os grupos controles (exercício e controle) receberam injeção com solução veículo e foram eutanasiados junto com os grupos tratados 8 horas pós-dose. O cólon do animal foi retirado, cortado transversalmente na borda do ceco e aberto pela sua borda mesentérica. A parte distal do cólon foi dividida longitudinalmente em duas partes, uma foi fixada em formalina 10% por 24h e submetida ao processo rotineiro de inclusão em parafina para análises histológicas, enquanto a outra parte foi armazenada em nitrogênio e encaminhada para extração de RNA e

DNA para análises moleculares. Assim como no experimento I o peso corporal total, do coração e da gordura epididimal foram aferidos.

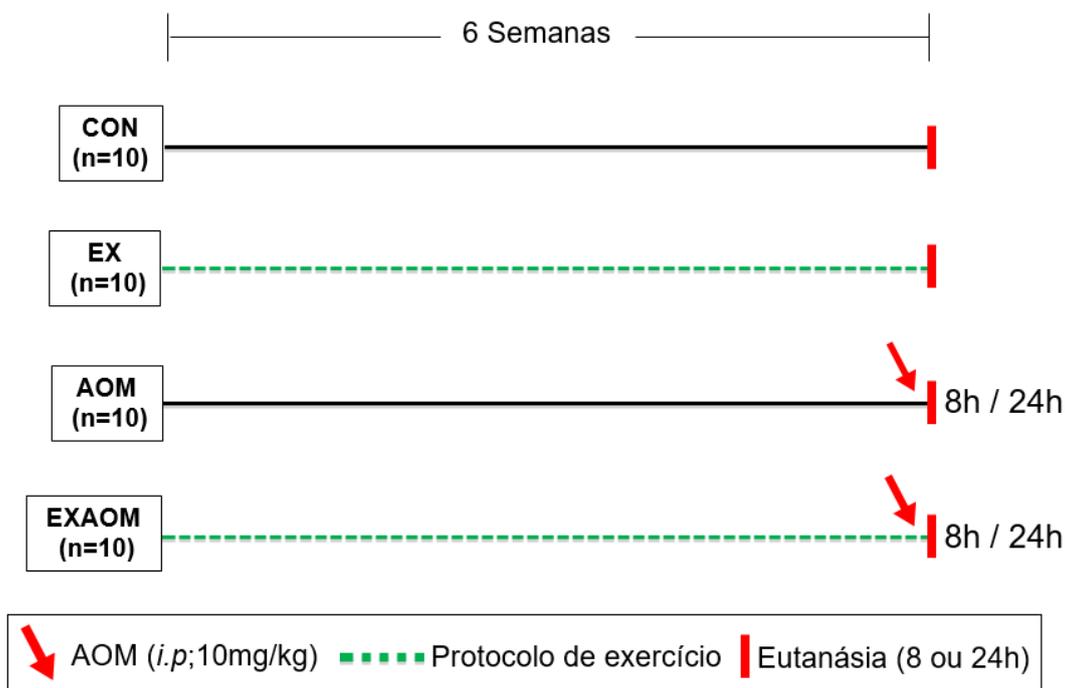


Figura 3.3: Grupos do Experimento II. Controle sem exercício (CON); Controle com exercício (EX); sem exercício, tratado com azoximetano (AOM); exercitado e tratado com azoximetano (EXAOM). A eutanásia nos grupos com tratados com azoximetano foi subdividida em 8 ou 24 horas após a injeção de carcinógeno.

3.4.1 IMUNOHISTOQUÍMICA

As reações de imunohistoquímica foram feitas em cortes histológicos transversais do cólon. Nesta técnica, um conjugado de anticorpos e corantes se ligam a proteína de interesse, tornando essa marcação visível ao microscópio. Para a marcação dos cortes histológicos, foram obtidos cortes de 4 μm de espessura, aderidos em lâminas sinalizadas, desparafinizadas em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Após resfriamento, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da aplicação de peróxido de hidrogênio a 3% ao qual foram adicionados os anticorpos primários monoclonal mouse anti-gamma H2AX (phospho S140), marca ABCAM (AB 22551) na concentração 1:200.

3.4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA E DNA

Na extração de *DNA* e *RNA* o tecido colônico foi macerado e foi utilizado o *DNeasy Mini kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Para a extração de *RNA* foi realizado o seguinte protocolo: Adicionar 500µL de trizol em um *ependorf*; incubar amostra homogeneizada por 5 minutos em temperatura ambiente; adicionar 100µL de clorofórmio; homogeneizar e esperar 2-3 minutos em temperatura ambiente; encaminhar a centrífuga (12.000g; 15 minutos; 4°C); remover fase aquosa e transferir para um novo tubo; adicionar 250µL de isopropanol; incubar a temperatura ambiente por 10 minutos; encaminhar a centrífuga (12.000g; 10 minutos; 4°C); remover o sobrenadante; lavar o *pellet* com 500µL de etanol 75%; encaminhar a centrífuga (7.500g; 5 minutos; 4°C); descartar sobrenadante e secar o *pellet* (55-60°C por até 5 minutos); ressuspender o pellet em água deionizada auto-clavada. Para a extração de *DNA*: adicionar 500µL de solução de digestão; adicionar 10µL de proteinase K e homogeneizar; adicionar 200µL de *NaCl* e homogeneizar; encaminhar a centrífuga (13000rpm; 10 minutos; 4°C); remover fase aquosa e transferir para um novo tubo; adicionar 500µL de isopropanol; encaminhar a centrífuga (13000rpm; 10 minutos; 4°C); remover o sobrenadante; lavar o pellet com 500µL de etanol 70%; encaminhar a centrífuga (13000rpm; 10 minutos; 4°C); descartar sobrenadante e secar o pellet (55-60°C por até 5 minutos); ressuspender o pellet em água deionizada auto-clavada.

O material de *DNA* extraído foi armazenado em freezer -20°C e foram utilizadas no sequenciamento para mutações em *KRAS* e *β-Catenina* e na avaliação do perfil de metilação de *LINE-1* e das regiões promotoras de *MGMT* e *MLH1*. O *RNA* extraído foi armazenado em freezer -80°C e utilizado para as análises de expressão gênica.

A quantificação e determinação da pureza das amostras de *RNA* e *DNA* foram obtidas pelo espectrofotômetro *NanoDrop* (Uniscience), aplicando-se 1 µL da solução de *RNA/DNA* extraído no leitor óptico do aparelho. O aparelho foi configurado aos parâmetros de mensuração para concentração de ácidos nucléicos, determinados pela absorvância em comprimento de onda de 260nm. A máquina fornece a concentração de *RNA/DNA* gerada em µg/µL e o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a absorvância em 260nm e a absorvância em 280 e 230nm (comprimentos de onda referentes a concentração

de proteínas contaminantes). As amostras eram consideradas puras quando esta razão era igual ou superior ao valor de 1,7.

3.4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão gênica foi obtida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (*qPCR* ou *PCR* em tempo real). Essa técnica permite se observar em tempo real a geração de novas cópias de sequências de interesse do DNA ao longo da reação. Isso é possível pois o termociclador utilizado é equipado com detectores de fluorescência que acompanham o processo de amplificação a cada ciclo através da captação de sinal luminoso emitido pelo fluoróforo (*SYBR Green*) que emite sua fluorescência após interagir com o DNA ao longo da reação.

Para a amplificação do RNA extraído das amostras primeiro este deve ser convertido em forma de DNA complementar (*cDNA*) pela reação de transcrição reversa (*RT*). Essa etapa é essencial pois as moléculas de RNA são muito instáveis e também pelo fato da amplificação da reação se dar pela ação de uma DNA polimerase, então é necessária uma fita de DNA para que ocorra a polimerização dos transcritos.

Primeiro, o RNA extraído passou por uma reação com uma *DNase*, para purificar a amostra de possíveis resíduos de DNA. Na reação com a *DNase*, 1500ng de RNA e água *RNase-free* somavam 8µL e a esta eram adicionados 1µL da *DNase I* (Sigma) e 1µL de *Reaction Buffer 10x* (Sigma). Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente foi adicionado a reação 1µL de *stop solution* (Sigma) e por fim foi colocada no termociclador *PTC-200* (MJ Research) à 70°C por 10 minutos, encerrando assim a atividade da *DNase*.

Para a reação de *RT* foram adicionados ao produto da reação com a *DNase*, 1µL de primer randômico (Promega), 1µL de *dNTPs* a 10mM e subsequente levado a incubação por 5 minutos a 65°C no termociclador. Em seguida, foram adicionados 4µL do tampão da enzima transcriptase reversa (5X, *Invitrogen*) e 2µL de *DTT* 0,1M (*Invitrogen*) e subsequente incubação por 2 minutos em temperatura ambiente. A seguir foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa *SuperScript II®* (200 U) e as reações foram incubadas no termociclador por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C e a inativação da enzima feita em 70°C por 15 minutos. Após a síntese, o *cDNA* foi armazenado a -20°C.

O sistema *Rotor-Gene Q* (Qiagen) foi utilizado para o *qPCR*. Para esta foram utilizados um controle interno ao fluxo e outro externo ao fluxo e para cada amostra foram feitas reações em duplicatas. Na reação foram adicionados 5µL de tampão *QuantiFast SYBR Green* (Qiagen), 0,3 µL dos *primers* senso e anti-senso das sequências alvo a 10µM (Tabela 3.2), 1µL de *cDNA* diluído a 1:20 e 3,4µL de água deionizada auto-clavada. As condições para as reações de *qPCR* foram as seguintes: Pré-desnaturação das fitas de *DNA* (5 minutos a 95°C); 40 ciclos de desnaturação (5 segundos a 95°C) seguido por anelamento e extensão (etapas integradas – 10 segundos a 60°C); Curva de dissociação (65°C -95°C). A quantificação relativa da expressão de *RNA* foi feita através do método de ΔC_t (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008) utilizando a β -*actina* como gene de referência (*housekeeping*).

Tabela 3.2: Sequências dos primers utilizados na amplificação dos genes alvo por *qPCR*.

Genes	Sequências dos primers (5'-3')
MGMT	Senso: AAACACTGACCCCACAGAGGC Anti-senso: TCTGTGGCTGCGGGTTCA
APOBEC3	Senso: CACCGCATGAAGCCCTATCT Anti-senso: ATGCTGTTTGCCTTTCTCGC
DNMT3A	Senso: GCCGAATTGTGTCTTGGTGGATGACA Anti-senso: CCTGGTGGAAATGCACTGCAGAAGGA
DNMT1	Senso: CCTAGTTCCGTGGCTACGAGGAGAA Anti-senso: TCTCTCTCCTCTGCAGCCGACTCA
TET2	Senso: AGGGACCAGAACCAGGCT Anti-senso: TGCCCTTTGAATGAATCCAGC
B-Actina	Senso: ACTGTCGAGTCGCGTCCA Anti-senso: ATCCATGGCGAACTGGTGG

3.4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO

Foi utilizada a técnica padrão-ouro de pirosequenciamento para a análise quantitativa sobre o perfil de metilação gênico. A reação inclui *primers* que guiam a *DNA-polimerase* na síntese da região de interesse que deve ser sequenciada. Neste método é possível monitorar em tempo real tal sequenciamento graças a uma cascata de reações fotoquímicas desencadeadas por um *set* de enzimas

presentes na reação que geram luz em resposta a adição de uma base à fita molde de *DNA*.

Para que o sequenciamento ocorra, é adicionada à reação uma base do *DNA* (Adenina, timina, citosina ou guanina) e caso a adição dessa base não gere luz, significa que a base não é complementar ao da fita molde e assim é adicionada outra base. A incorporação da base correta resulta na produção de pirofosfato, que por sua vez reage com a enzima *adenosina-fosfo-sulfato* e a *ATP-sulforilase* produzindo ATP. A *luciferase* utiliza o ATP recém produzido para metabolizar a luciferina e produzir luz (proporcional ao número de bases incorporadas a fita), que por fim é captada pela máquina, que ao final da síntese completa nos dá a sequência de interesse.

Para que se possa analisar os níveis de metilação de um transcrito por meio desse método, o *DNA* extraído é tratado com bissulfito de sódio antes da etapa de amplificação por *PCR* convencional. O tratamento com bissulfito de sódio é responsável pela desaminação das citosinas não metiladas, convertendo-as em uracilas (futuramente convertidas em timina na etapa de amplificação por *PCR*) enquanto as citosinas metiladas não sofrem desaminação e permanecem inalteradas (HERMAN; GRAFF; MYÖHÄNEN; NELKIN *et al.*, 1996; PATTERSON; MOLLOY; QU; CLARK, 2011). Sabendo que as citosinas do *DNA* passíveis de metilação são aquelas seguidas de uma guanina, ao fim do pirosequenciamento a quantificação da metilação é possível pois sabemos que aquelas citosinas (seguidas de guanina) não transformadas em timinas se encontravam metiladas.

Após a conversão com o bissulfito pelo kit *MethylEdge™ Bisulfite Conversion System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante: Colocar 20µL do *DNA* extraído em tubo de *PCR* de 200µL; Adicionar 130µL de *Bisulfite ME Conversion* (Promega); Encaminhar ao termociclador (98°C por 8 minutos; 54°C por 1 hora) e em seguida armazenar em 4°C ou gelo e protegido de luz; Colocar as *ME Spin Columns* nos tubos coletores (Promega); Adicionar 600µL de *ME Binding Buffer* nos *ME Spin Columns* e em seguida transferir o *DNA* tratado com bissulfito para a reação e misturar por inversão; encaminhar para a centrífuga (Spin na velocidade máxima por 30 segundos); Descartar o líquido no tubo coletor e reinserir no *ME Spin Column*; adicionar 100µL de *1x ME Wash Buffer* (Promega) e encaminhar para a centrífuga (Spin na velocidade máxima

por 30 segundos); adicionar 200µL de *ME Desulphonation Buffer* e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos; encaminhar para a centrifuga (*Spin* na velocidade máxima por 30 segundos); adicionar 200µL de *1x ME Wash Buffer* (Promega) e encaminhar para a centrifuga (*Spin* na velocidade máxima por 30 segundos); Repetir etapa anterior; Colocar o *ME Spin column* em um novo tubo; adicionar 10µL de *ME Elution Buffer* e encaminhar para a centrifuga (*Spin* na velocidade máxima por 30 segundos); Descarte o *ME Spin Column* e armazene o *DNA* convertido a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Após a conversão de bissulfito, foi realizada uma *PCR* convencional para a amplificação de *LINE-1*, marcador de metilação global do *DNA* (CUYÀS; FERNÁNDEZ-ARROYO; VERDURA; GARCÍA *et al.*, 2018), e de regiões de interesse (ilhas CpG em região promotora) de *MGMT* e *MLH1*. O *PCR* convencional possui o mesmo princípio do *qPCR*, mas por não utilizar um fluoróforo na reação, não é possível observar a amplificação do transcrito em tempo real. As reações de *PCR* foram feitas no termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystems) e nas seguintes condições:

LINE-1. 5µL de *10X Buffer* (Invitrogen), 1,5µL *MgCl₂* 50mM (Invitrogen), 1µL de *dNTP* 10mM, 1µL de *primer* senso e 1µL de *primer* anti-senso (Tabela 3.3), 0,2µL da enzima *Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 37,3µL de água deionizada auto-clavada e 1µL da amostra de *DNA* (1x [94°C por 3 minutos]; 50x [94°C por 45 segundos + 60°C por 45 segundos + 72°C por 45 segundos]; 1x [72°C por 10 minutos]); **MLH1.** 5µL de *10X Buffer* (Invitrogen), 2,5µL *MgCl₂* 50mM (Invitrogen), 1µL de *dNTP* 10mM, 1,5µL de *primer* senso e 1,5µL de *primer* anti-senso (Tabela 3.3), 0,2µL da enzima *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 36,3µL de água deionizada auto-clavada e 2µL da amostra de *DNA* (1x [95°C por 5 minutos]; 50x [95°C por 30 segundos + 60°C por 45 segundos + 72°C por 30 segundos]; 1x [72°C por 10 minutos]); **MGMT.** 10µL de *5X Buffer* (Promega), 4µL *MgCl₂* 25mM (Promega), 1µL de *dNTP* 10mM, 1µL de *primer* senso e 1µL de *primer* anti-senso (Tabela 3.3), 0,25µL da enzima *GoTaq® G2 Hot Start polymerase* (Promega), 31,75µL de água deionizada auto-clavada e 1µL da amostra de *DNA* (1x [94°C por 3 minutos]; 50x [94°C por 45 segundos + 56°C por 30 segundos + 72°C por 45 segundos]; 1x [72°C por 10 minutos]). Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose (2%) para confirmar a amplificação dos amplicons.

O DNA amplificado foi transferido para a placa de pirosequenciamento e por fim, os níveis de metilação dos sítios CpG foram determinados pelo pirosequenciador PyroMark Q96 ID (Qiagen).

Tabela 3.3: Sequências dos primers utilizados na amplificação para pirosequenciamento.

Genes	Sequências dos primers (5'-3')
LINE-1	Senso: TATAGAGGGGTTGAGGTAGTATTTTGTGTG Anti-senso: Biotina-CCAAAACAAAACCTTTCTCAAACACTATAT Sequenciamento: ATTTTGTGTGGGT
MLH1	Senso: TGTGTATAATGGGAAATTAGTTTGGTA Anti-senso: Biotina - ATTCATACTACCCAATCAACACTT Sequenciamento: GTTGAATGATTTTTT
MGMT	Senso: GTTTGATGTTTAGGATGGGTAAAG Anti-senso: Biotina - ATACCCCAAACCTCACCAACT Sequenciamento: TTAGGGAGGAAGTATAGA

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* versão 8.0 (GraphPad Software). As análises com o valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para determinar se as distribuições das amostras seguem uma aproximação gaussiana, separando-as em paramétricas ou não-paramétricas. Na comparação entre mais de dois grupos, a diferença entre as médias nas distribuições paramétricas foi determinada por *One-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni* e nas não-paramétricas pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. Já na comparação entre dois grupos, os valores paramétricos foram analisados pelo teste *T* não-pareado, e os valores não-paramétricos com o teste *Mann Whitney*. Para relação de duas variáveis independentes sobre uma variável dependente foi aplicado o teste de *Two-way ANOVA* e o pós-teste de *Bonferroni*. Nas análises de contingência foi aplicado o teste exato de Fischer. Por fim, para as correlações foram utilizados o coeficiente de correlação de Pearson (distribuições paramétricas) e de Spearman (distribuições não-paramétricas).

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I – AOM CRÔNICO

No primeiro experimento investigamos o efeito do exercício físico regular sobre a fase de promoção da carcinogênese colônica. Utilizando um modelo químico baseado no tratamento crônico com AOM (6 doses, 1x por semana, 10mg/kg), analisamos o impacto de diferentes momentos do exercício sobre a formação de lesões pré-neoplásicas no cólon em comparação ao grupo controle sedentário (AOM_CR). Aplicamos o protocolo de exercício aeróbico, progressivo por 6 semanas, em dois momentos: prévio (EX_PRE), ou concomitante ao tratamento crônico com AOM (EX_DUR).

Após 14 semanas de experimento, o tratamento crônico com AOM e a intervenção com exercício não promoveram diferenças no peso relativo do coração ou da gordura epididimal (Tabela 4.1). Ambos os grupos que executaram o protocolo de exercício tenderam a um menor ganho de peso total em comparação ao grupo AOM_CR, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Ganho do peso total e peso relativo do coração e da gordura epididimal dos camundongos durante as quatorze semanas de experimento.

Grupos	Ganho de peso total (g)	Coração (%/ Peso final)	Gordura Epididimal (%/ Peso final)
AOM_CR	4,0 ± 2,0	0,4 ± 0,03	1,3 ± 0,2
EX_PRE	2,5 ± 0,7	0,5 ± 0,03	1,4 ± 0,2
EX_DUR	2,7 ± 1,7	0,5 ± 0,03	1,2 ± 0,2

AOM_CR: Tratamento crônico com AOM sem exercício; **EX_PRE:** Protocolo de exercício físico prévio ao tratamento crônico com AOM; **EX_DUR:** Protocolo de exercício físico concomitante ao tratamento crônico com AOM; Dados apresentados em média ± DP; *One-way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.

Em seguida, analisamos a incidência e a multiplicidade de lesões pré-neoplásicas entre os grupos tratados cronicamente com AOM. Para isso analisamos a formação de criptas aberrantes (CA) e criptas com depleção de mucina (CDM) e seus respectivos focos (Figura 4.1).

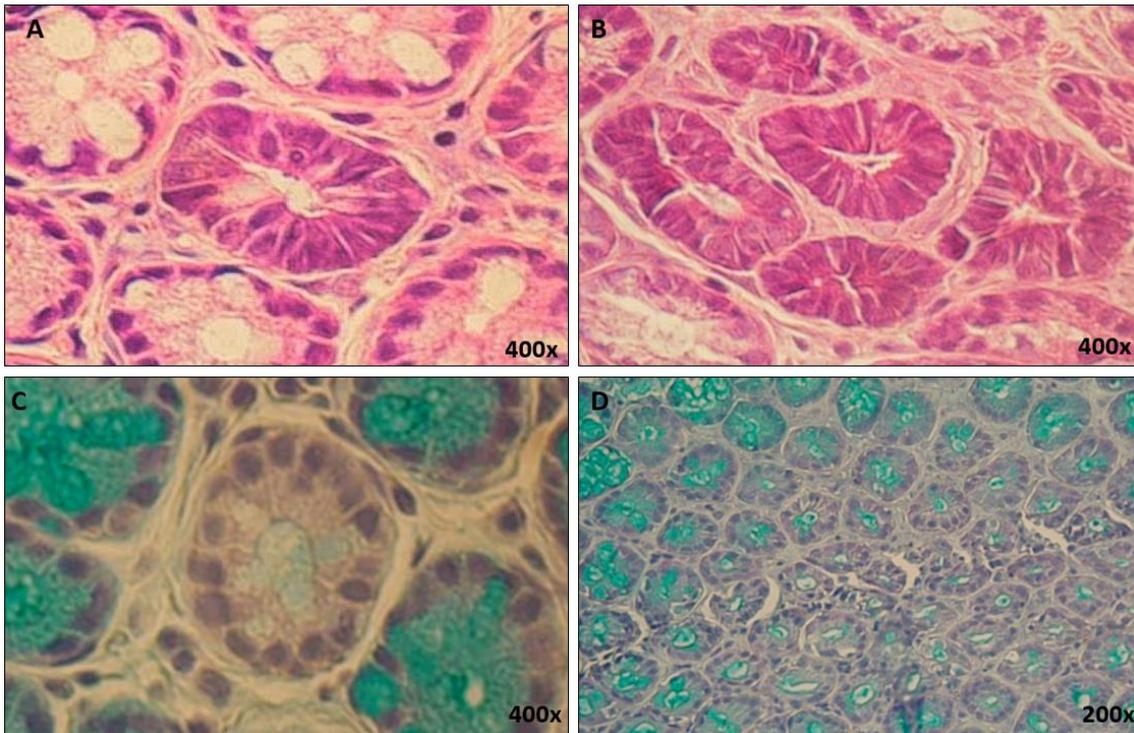


Figura 4.1: Marcadores histológicos de lesões precursoras de tumor no cólon pela coloração por hematoxilina e eosina (A e B) e alcian blue (C e D). (A) CA: Cripta aberrante (400x); (B) FCA: Foco de cripta aberrante (FCA) (400x); (C) CDM: Cripta com depleção de mucina (400x); (D) FDM: Foco com depleção de mucina (200x).

Tabela 4.2: Incidência e multiplicidade de focos de lesões pré-neoplásicas no cólon.

Grupos	CA e FCA		CDM e FDM	
	Multiplicidade de criptas únicas/mm ² (Mín-Máx)	Incidência de focos (RR/ 95% CI)	Multiplicidade de criptas únicas/mm ² (Mín-Máx)	Incidência de focos (RR/ 95% CI)
AOM_CR	0,85 (0,3 – 2,4)	66,6% (1, Referência)	0,86 (0,2 – 1,2)	50% (1, Referência)
EX_PRE	0,72 (0,1 – 1,6)	44,4% (0,78/ 0,26-1,98)	0,31 (0,2 – 0,6)	0% (0,35/ 0,17-0,72)*
EX_DUR	0,80 (0,2 – 2,3)	77,7% (1,30/ 0,44-3,05)	0,38 (0,1 – 0,6)	25% (0,58/ 0,24-1,39)

CA: Cripta aberrante; FCA: Foco de cripta aberrante; CDM: Cripta com depleção de mucina; FDM: Foco com depleção de mucina; Mín: Valor mínimo; Máx: Valor máximo; Dados apresentados em porcentagem (Incidência) e Mediana e Range (Multiplicidade); Teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn* (Multiplicidade) e teste exato de *Fischer* (Incidência); * $p < 0,05$ EX_PRE vs. AOM_CR.

O protocolo de exercício físico, tanto aplicado previamente quanto realizado durante a exposição crônica do AOM não promoveu diferenças significativas na formação de CA ou FCA (Tabela 4.2). Ambos os momentos de

exercício físico apresentaram tendência a produzir uma menor multiplicidade de CDM (redução maior que 50%) em comparação ao grupo controle, mas essas alterações não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Tabela 4.2). O grupo submetido ao exercício prévio ao tratamento com AOM (EX_PRE) apresentou um risco relativo (RR) significativamente menor de desenvolver FDM em comparação ao controle (RR 0,35; 95%CI: 0,17-0,72; $p = 0,03$; Tabela 4.2). O grupo exercitado no mesmo período do tratamento com AOM (EX_DUR) apresentou uma incidência 50% menor de FDM que o controle, mas não reduziu significativamente o risco do desenvolvimento dessa lesão (RR 0,58; 95%CI: 0,24-1,39; $p = 0,34$; Tabela 4.2).

Por fim, nos perguntamos se o exercício promoveria algum impacto sobre a formação de potenciais mutações de genes classicamente envolvidos na carcinogênese colônica nas células do cólon de camundongos tratados cronicamente com AOM. Por seu conhecido papel na carcinogênese do cólon, analisamos a presença de mutações dos genes *KRAS* e *CTNNB1* por sequenciamento do DNA (método Sanger), mas nenhuma mutação foi identificada em qualquer dos camundongos tratados com AOM, submetidos ou não ao exercício físico.

4.2 EXPERIMENTO II – AOM AGUDO

Os dados do experimento I mostraram que o exercício prévio foi superior ao exercício físico durante o tratamento com AOM em reduzir a formação de FDM no cólon. Afim de compreender melhor esse efeito protetor do exercício físico, investigamos se o mesmo atuaria sobre mecanismos de iniciação tumoral induzidos pelo AOM. Para isso, realizamos um segundo experimento focado nos efeitos agudos de uma única dose de carcinógeno em animais previamente submetidos ao protocolo de exercício.

Nesse experimento os animais foram divididos em quatro grupos, dentre eles, dois grupos controles (um sedentário, **CON**; e outro com exercício físico, **EX**) e mais dois grupos submetidos às mesmas condições e que receberam uma dose única (10mg/kg) de AOM ao final das 6 semanas de experiemnto (um sedentário, **AOM**; e um com exercício físico, **EXAOM**). A fim de observar a dinâmica de dano e reparo do DNA causado pelo AOM, e da regulação do

exercício sobre esses pontos, subdividimos os grupos tratados (AOM e EXAOM) em dois tempos de eutanásia pós-dose de AOM (8 e 24 horas).

A exposição aguda ao AOM, com ou sem exercício físico, não alterou o ganho de peso total e o peso relativo da gordura epididimal entre os grupos. No entanto, os animais do grupo exercício físico (EX) apresentaram maior peso relativo do coração em comparação aos demais grupos ($p < 0,0001$; Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Ganho do peso total e peso relativo do coração e da gordura epididimal dos camundongos durante as seis semanas de experimento II.

Grupos	Ganho de peso total (g)	Coração (%/ Peso final)	Gordura Epididimal (%/ Peso final)
CON	2,8 ± 1,5	0,5 ± 0,05	1,5 ± 0,1
EX	2,1 ± 0,8	0,7 ± 0,05*	1,4 ± 0,2
AOM	1,9 ± 1,7	0,5 ± 0,0	1,5 ± 0,3
EX_AOM	2,2 ± 1,8	0,5 ± 0,04	1,3 ± 0,1

CON: Controle sedentário (sem dose de AOM); EX: Controle exercício (sem dose de AOM); AOM: Sedentário (com dose única de AOM); EX_AOM: Exercício (com dose única de AOM); Dados apresentados em média ± DP; * $p < 0,0001$ EX vs. todos os grupos; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Visando elucidar se o exercício regular prévio à exposição ao carcinógeno promoveria maior proteção do tecido colônico à insultos genotóxicos agudos provenientes do AOM, analisamos inicialmente a formação de focos de γ H2AX, um marcador de quebras duplas de DNA (Figura 4.2A). A dose única de AOM induziu um aumento não significativo da formação de γ H2AX em ambos os grupos após 8 horas ($p > 0,05$; Figura 4.2B). Contudo, 24 horas após a administração de AOM, o grupo exercitado apresentou uma formação de quebras-duplas 5 vezes menor em comparação ao grupo sedentário ($p < 0,05$; Figura 4.2B).

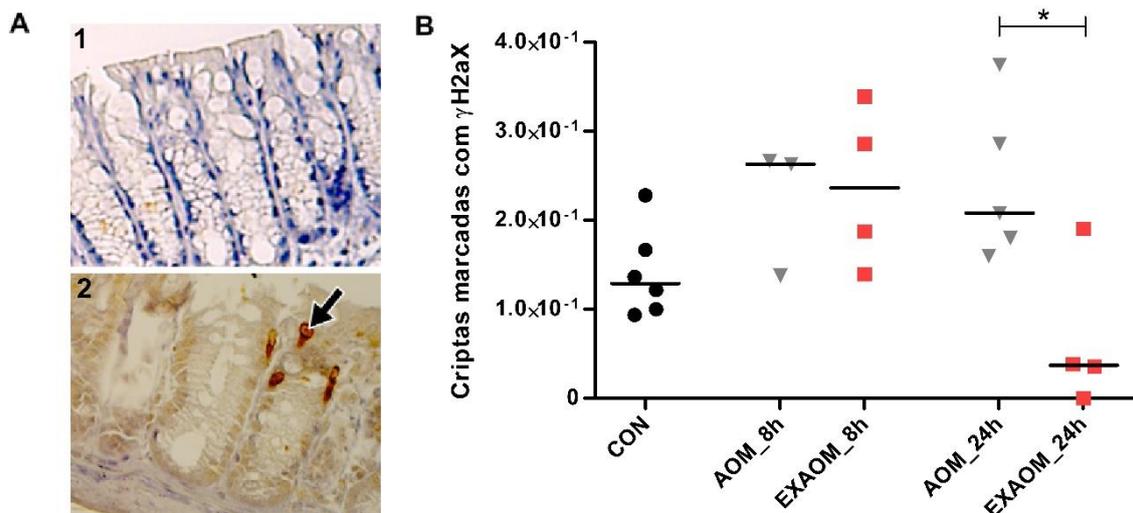


Figura 4.2: Avaliação da formação de quebras-duplas do DNA por imunohistoquímica. (A) Fotos ilustrativas da marcação de yH2AX por imunohistoquímica (A1=Criptas sem marcação de yH2AX; A2=Criptas com marcação positiva de yH2AX); Seta preta: foco de yH2AX; (B) Criptas com marcação positiva para yH2AX ajustado pelo total de criptas; Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de *Dunn*; * $p < 0,05$. AOM_24h vs. EXAOM_24h, *Two-way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni.

Em seguida, para entender a influência do exercício sobre a formação de quebra-dupla induzida pelo AOM, avaliamos a expressão gênica de *MGMT*, enzima responsável pela primeira resposta de reparo aos adutos genotóxicos provocados por AOM. Para tal, analisamos as respostas do exercício em dois contextos: grupos controles (sem exposição ao AOM) e grupos tratados (com exposição ao AOM). Entre os grupos sem exposição ao AOM, o exercício não alterou os níveis de expressão gênica de *MGMT* (Figura 4.3A). Nos grupos tratados com AOM, houve uma tendência a maior expressão de *MGMT* 8 horas após a dose de AOM (AOM: 59%, $p=0,089$; EXAOM: 48%, $p=0,047$), em comparação ao grupo controle. Seguindo um padrão similar à marcação de yH2AX, enquanto o grupo EXAOM restabeleceu os níveis de expressão de *MGMT* aos padrões basais (grupo controle) após 24 horas (Figura 4.3B), no grupo AOM, a expressão de *MGMT* se mostrou significativamente maior em relação ao controle (69%; $p=0,002$; Figura 4.3B).

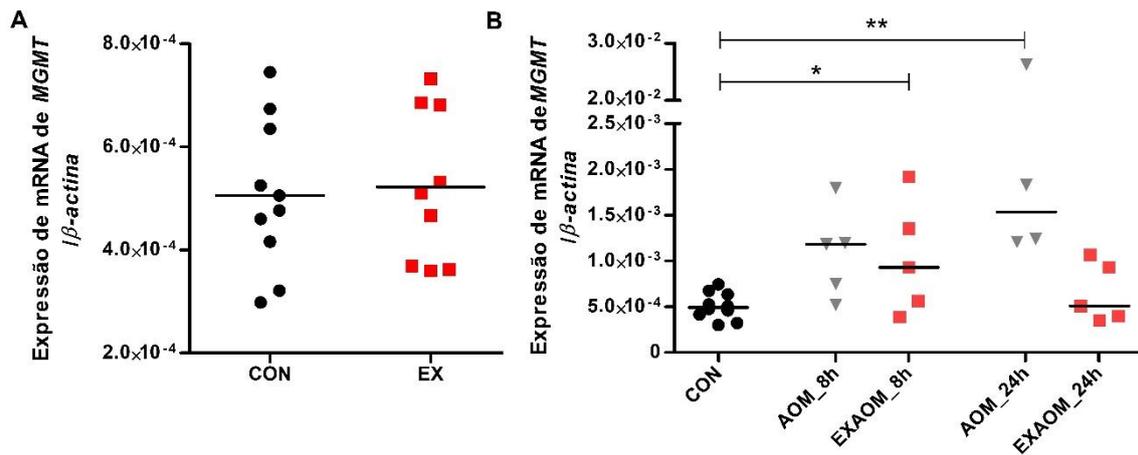


Figura 4.3: Expressão gênica de *Mgmt* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Mgmt* nos grupos controles (CON e EX); (B) Níveis de mRNA de *Mgmt* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); * $p < 0,05$ CON vs. EXAOM_8h, One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; ** $p < 0,005$ CON vs. AOM_24h, Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Em sequência ao reparo de O^6 MeG pela *Mgmt*, uma segunda etapa de reparo de erros do processo de replicação do DNA é decorrente da atividade de *mismatch*. Assim, analisamos a expressão gênica de *Mlh1*, gene envolvido no reparo do DNA por *mismatch* e muitas vezes hipermetilado em lesões polipoides em seres humanos. Contudo, o AOM ou exercício prévio pouco alteraram a expressão deste gene entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle (Figura 4.4A-B).

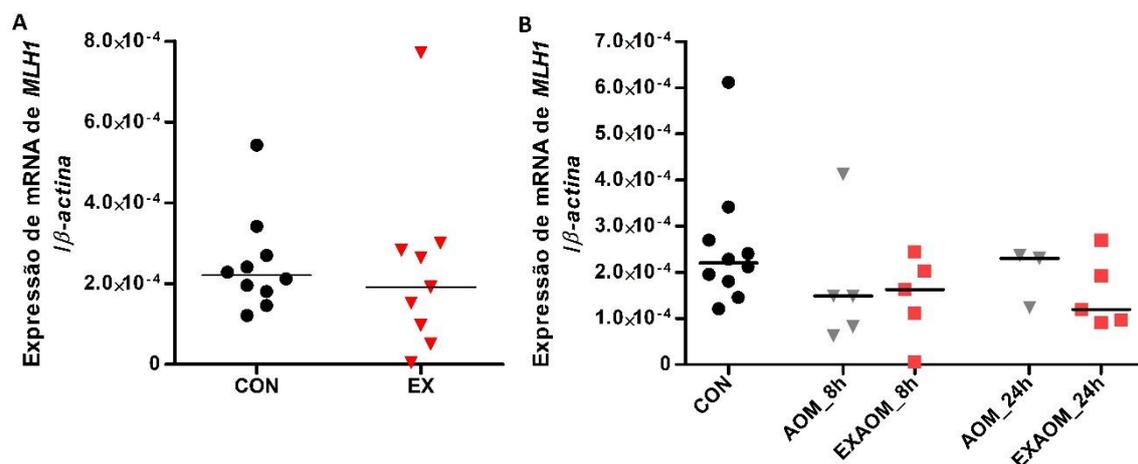


Figura 4.4: Expressão gênica de *Mlh1* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Mlh1* nos grupos controles (CON e EX); Teste de Mann Whitney; (B) Níveis de mRNA de *Mlh1* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Em seguida analisamos se o exercício poderia alterar os padrões de metilação em sítios CpG localizados na região promotora dos genes envolvidos no reparo do DNA, previamente analisados, *Mgmt* (3 sítios CpG) e *Mlh1* (7 sítios CpG). Assim como nos níveis de expressão gênica, os níveis de metilação foram analisados em dois contextos: Grupos controles, sedentário (CON) e exercício (EX); Grupos tratados com AOM, sedentário (AOM) e exercício (EXAOM), 8 e 24h pós-AOM.

Todos os sítios CpG analisados em *Mgmt* se encontraram significativamente hipermetilados no grupo EX em relação ao controle sedentário ($p < 0,05$; Figura 4.5A). O exercício induziu maiores níveis de metilação no sítio CpG1 em 68%, no sítio CpG2 em 24% e no sítio CpG3 em 17% ($p < 0,05$; Figura 4.5A). A metilação média no grupo EX foi 27% maior em comparação ao CON ($p = 0,0043$; Figura 4.5A). Entre os grupos tratados com o carcinógeno, o grupo AOM apresentou uma tendência de aumento tempo-dependente da média de metilação dos sítios CpG, se tornando significativamente maior ao controle após 24 horas (35%, $p = 0,043$; Figura 4.5B). Este aumento progressivo da metilação de *Mgmt* não foi observado no grupo EXAOM, que em 24 horas mantém os níveis de metilação de *Mgmt* inalterados em relação ao controle (Figura 4.5B).

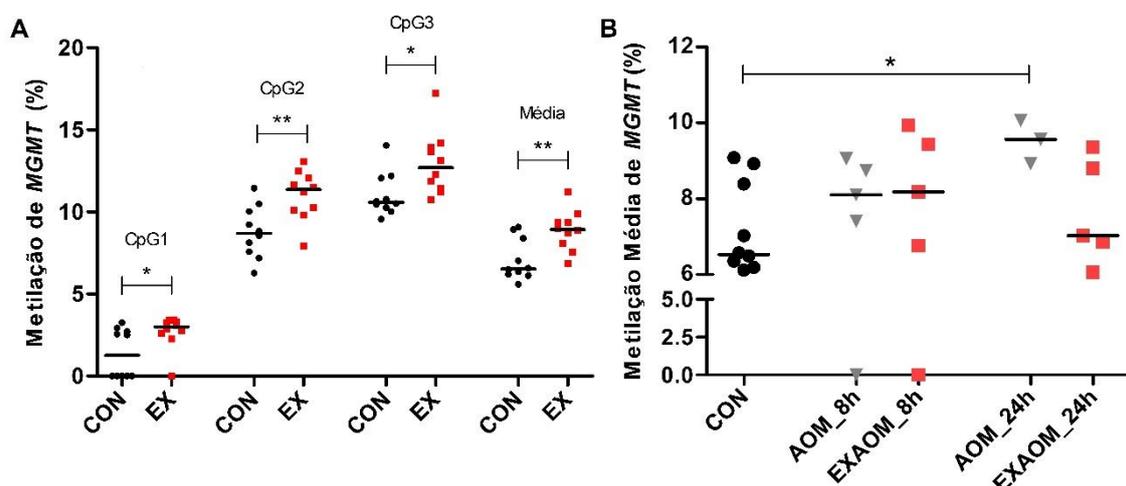


Figura 4.5: Perfil de metilação de *Mgmt*. (A) Grupos CON e EX (Metilação de CpG 1, 2, 3 e média); ** $p < 0,005$ CON vs. EX, Teste T não-pareado (Média e CpG2); * $p < 0,05$ CON vs. EX, Teste de Mann Whitney (CpG1 e 3); (B) Grupos CON, AOM e EXAOM, 8 e 24h pós-dose (Metilação média); * $p < 0,05$. CON vs. AOM_24h, Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni;

Para *Mlh1*, o baixo número de animais com metilação mensurável nos sítios analisados inviabilizou uma comparação estatística confiável entre os grupos, assim como para a análise de correlação de sua expressão com seus níveis de metilação. Essas análises se encontram descritas no material suplementar (Figura Suplementar 8.1).

Depois de analisar o nível de metilação dos genes descritos acima, investigamos se haveria uma correlação entre os níveis de metilação e de expressão de *Mgmt*. No entanto, não encontramos nenhuma correlação significativa (Figura 4.6A-B).

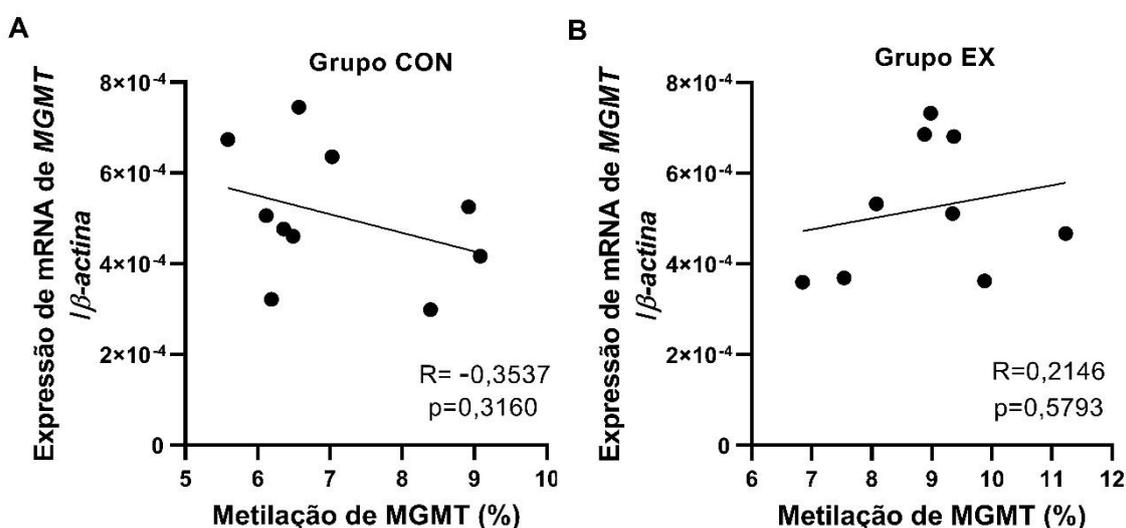


Figura 4.6: Correlação entre os níveis de metilação e de expressão de *Mgmt* (Coeficiente de correlação de Pearson) nos grupos CON (n=10) e EX (n=10). (A) Correlação entre metilação e expressão de *Mgmt* no grupo CON; (B) Correlação entre metilação e expressão de *Mgmt* no grupo EX.

Após identificarmos alterações sobre a metilação de regiões promotoras de *MGMT* em resposta adaptativa à prática de exercício, nos perguntamos se esse fenômeno estaria ligado a uma regulação do exercício sobre a expressão de enzimas da regulação de metilação do DNA.

Ao analisar a expressão dos genes *Dnmt1* e *Tet2* nos animais submetidos ou não ao exercício e/ou administração de AOM, não observamos alteração na expressão dessas enzimas, conforme mostram as figuras 4.7 (A-D).

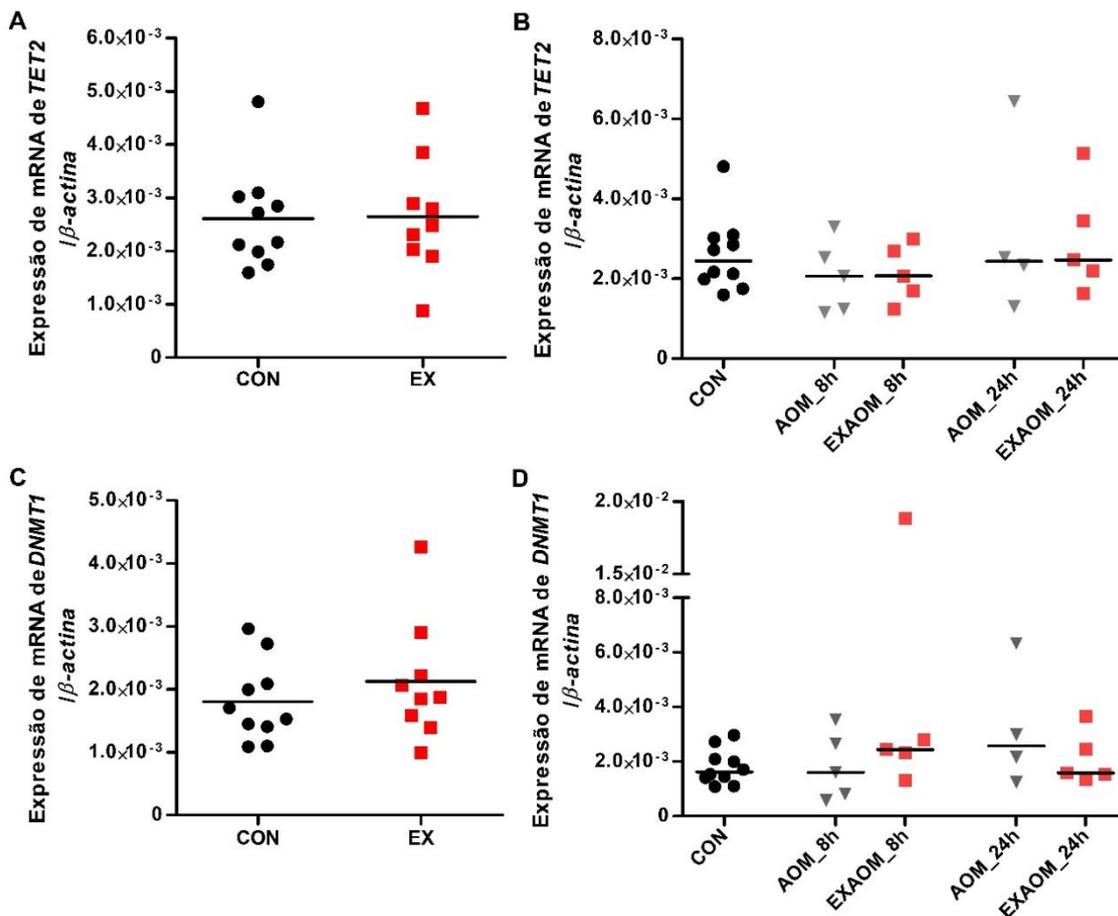


Figura 4.7: Expressão gênica de *Tet2* e *Dnmt1* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Tet2* nos grupos controles (CON e EX); Teste T não-pareado; (B) Níveis de mRNA de *Tet2* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; (C) Níveis de mRNA de *Dnmt1* nos grupos controles (CON e EX); Teste T não-pareado; (D) Níveis de mRNA de *Dnmt1* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Também analisamos a expressão dos genes *Dnmt3a* e *Apobec3*, conforme demonstra a Figura 4.8 (A-D). O grupo EX apresentou uma expressão de *Dnmt3a* 66% maior que o grupo controle sedentário, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,089$; Figura 4.8A). Entre os grupos expostos ao AOM não foram identificadas alterações na expressão de *Dnmt3a* (Figura 4.8B).

Nos grupos controles, observamos uma expressão de *Apobec3* três vezes menor no grupo EX em comparação ao CON ($p<0,0001$; Figura 4.8C). Entre os grupos tratados com AOM, não houve alterações significativas em relação ao controle.

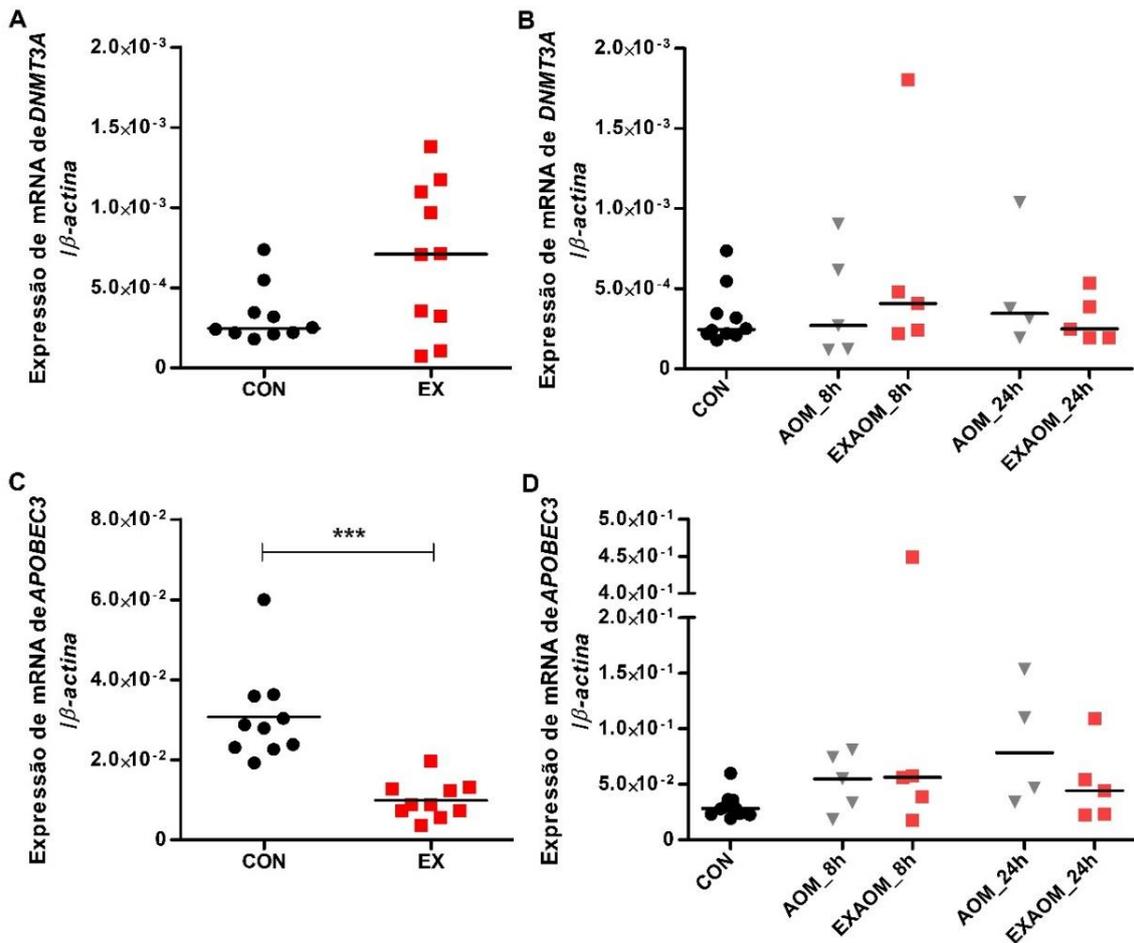


Figura 4.8: Expressão gênica de *Dnmt3a* e *Apobec3* por qPCR. (A) Níveis de mRNA de *Dnmt3a* nos grupos controles (CON e EX); Teste de Mann Whitney; (B) Níveis de mRNA de *Dnmt3a* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; (C) Níveis de mRNA de *Apobec3* nos grupos controles (CON e EX); * $p < 0,0001$ EX vs. CON, Teste T não-pareado; (D) Níveis de mRNA de *Apobec3* nos grupos CON e tratados (AOM e EXAOM, 8 e 24 horas pós-dose); Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Em seguida, investigamos se o tratamento com AOM ou o exercício físico poderiam impactar nos níveis de metilação de *Line-1* (indicador de metilação global do DNA). Entre os grupos controles não foram observadas alterações na metilação de *Line-1* (Figura 4.9A). O carcinógeno favoreceu uma maior metilação de *Line-1* no grupo AOM em 8 horas ($p=0,031$) mas não em 24 horas ($p=0,074$) comparado ao grupo controle (Figura 4.9B). No grupo EXAOM, a metilação de *Line-1* não apresentou mudanças significativas em 8 ($p > 0,05$) e 24 horas ($p=0,051$) (Figura 4.9).

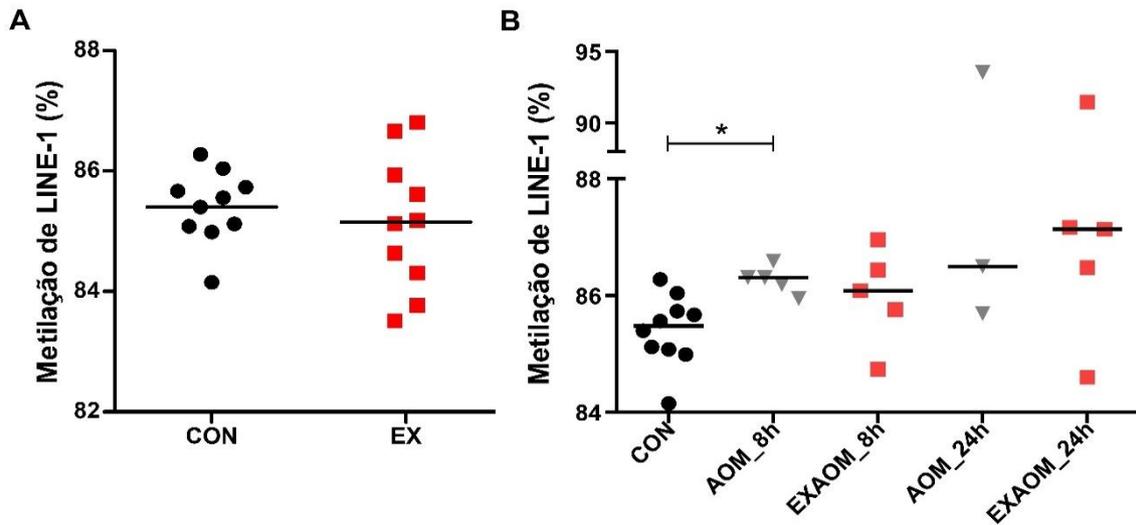


Figura 4.9: Perfil de metilação de *Line-1* (%). (A) Grupos CON e EX; Teste T não-pareado; (B) Grupos CON, AOM e EXAOM, 8 e 24h pós-dose; * $p < 0,05$ AOM_24h vs. CON, Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn; One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni; Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni;

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o Brasil passou por um acelerado crescimento socioeconômico e junto a isso observamos o aumento na prevalência de sobrepeso/obesidade e do sedentarismo na população brasileira (GUTHOLD; STEVENS; RILEY; BULL, 2018; PINTO; COSTA; MARQUES, 2013; VIGITEL, 2018). Esse cenário contribuiu para o aumento da incidência do câncer colorretal (atualmente o 2º câncer mais incidente no país) e outros tipos de câncer com etiologia ligada ao estilo de vida ocidentalizado (INCA, 2019).

Estudos de base epidemiológica indicam que indivíduos fisicamente ativos apresentam de 15 a 35% menor risco de desenvolver câncer de cólon em comparação a pessoas menos ativas e sedentárias (BALLARD-BARBASH; SCHATZKIN; ALBANES; SCHIFFMAN *et al.*, 1990; BOYLE; KEEGEL; BULL; HEYWORTH *et al.*, 2012; HARRISS; ATKINSON; BATTERHAM; GEORGE *et al.*, 2009; ROBSAHM; AAGNES; HJARTÅKER; LANGSETH *et al.*, 2013; WOLIN; YAN; COLDITZ; LEE, 2009). Contudo, os mecanismos por trás desse efeito protetor do exercício no câncer de cólon ainda não são claros.

Modelos pré-clínicos tem sido a principal ferramenta para a melhor compreensão dos mecanismos carcinogênicos e na validação de intervenções terapêuticas pelo exercício (ASHCRAFT; PEACE; BETOF; DEWHIRST *et al.*, 2016). Contudo, o foco dos modelos experimentais envolvendo exercício tem sido os mecanismos de promoção e progressão da doença, com pouco consenso sobre o melhor momento para se iniciar o protocolo de exercício. Sobretudo, são raros os estudos relacionados à iniciação da carcinogênese e como o exercício poderia prevenir a formação de lesões neoplásicas iniciais. Neste trabalho, primeiro investigamos o impacto do momento de aplicação do exercício aeróbio (antes ou durante à exposição crônica ao carcinógeno) sobre a formação de lesões pré-cancerígenas no cólon induzidos pelo AOM (Experimento I). De forma complementar, em um segundo experimento, focamos nossos estudos na fase de iniciação da carcinogênese. O objetivo foi investigar se o exercício físico protegeria o tecido do cólon logo na geração dos primeiros insultos carcinogênicos pelo AOM (Experimento II). Nossa hipótese era que o exercício prévio induz adaptações que conduzem o tecido exposto ao AOM à um reparo mais eficiente do DNA. Isso, por conseguinte, explicaria o efeito superior

do exercício prévio contra a formação de lesões pré-neoplásicas em fases mais avançadas da carcinogênese.

De forma geral nossos dados trazem os seguintes achados: 1) observamos que o momento de exercício aeróbio foi uma variável importante em determinar uma menor formação de lesões pré-neoplásicas nos camundongos. Animais exercitados previamente à aplicação crônica de AOM (EX_PRE) apresentaram, de forma significativa, uma menor incidência de FDM em comparação aos sedentários; 2) nossos dados indicam que o efeito anti-neoplásico do exercício regular ocorre desde as fases de iniciação tumoral. Vinte e quatro horas após a exposição à uma dose de AOM, os animais exercitados previamente apresentaram uma formação 5 vezes menor de quebras-duplas do DNA e uma menor expressão de *Mgmt* no cólon; 3) o exercício alterou a expressão gênica basal de enzimas da maquinaria de metilação do DNA e alterou os níveis de metilação da região promotora de *Mgmt* no tecido colônico.

Esses achados corroboram com nossa hipótese de que o exercício prévio capacita o tecido colônico em neutralizar eventuais insultos carcinogênicos, atuando na prevenção desde a fase de iniciação tumoral.

No experimento I o exercício físico realizado previamente ao tratamento com AOM não foi capaz de reduzir de forma significativa a formação de CA e FCA no cólon entre os grupos tratados, apesar de observarmos uma menor incidência de FCA (22%) e menor multiplicidade de CA (16%), em comparação aos sedentários (AOM).

As CA e os FCA foram descritas por Bird e colaboradores em 1987 (BIRD, 1987) e desde então são utilizadas como marcadores histológicos de lesões pré-neoplásicas, tanto em animais como em humanos (SAKAI; TAKAHASHI; KATO; UCHIYAMA *et al.*, 2011). Em modelos químicos *in vivo*, o exercício demonstrou ter um impacto protetor sob a formação de CA e FCA. Contudo a magnitude desse efeito protetor não tem sido homogênea entre os estudos e a variável momento de exposição ao exercício tem sido relevante. Lunz e colaboradores (2008) (LUNZ; PELUZIO; DIAS; MOREIRA *et al.*, 2008) e Fernandes e colaboradores (2015) (FERNANDES; MARINI; FRAJACOMO; JORDAO *et al.*, 2015) aplicaram protocolos de natação (35 e 8 semanas, respectivamente) após o tratamento com DMH e observaram a supressão (30% e em 3 vezes, respectivamente) na multiplicidade de FCAs no cólon de ratos, comparados ao

grupo não exercitado. Perse e colaboradores (2012) (PERŠE; INJAC; ŠTRUKELJ; CERAR, 2012) aplicaram um protocolo de natação de 23 semanas em ratos wistar antes e durante à exposição crônica ao AOM. Essa intervenção culminou na menor formação de CA ($\cong 50\%$) e tumores (50%) no cólon dos ratos treinados. Protocolos de corrida em esteira realizados durante e/ou após o tratamento com AOM também promoveram uma menor incidência e multiplicidade de CA e FCA no cólon de camundongos (AOI; NAITO; TAKAGI; KOKURA *et al.*, 2010; AOI; NAITO; TAKAGI; TANIMURA *et al.*, 2013; FUKU; OCHIAI; TERADA; FUJIMOTO *et al.*, 2007). O protocolo de exercício voluntário de 38 semanas de Reddy e colaboradores (1988) (REDDY; SUGIE; LOWENFELS, 1988), realizado após a exposição ao AOM, resultou em uma incidência 63% menor de tumores no cólon em comparação aos animais sedentários. Entretanto, Kelly e colaboradores (2017) (KELLY; ZHAO; JUNG; HUA *et al.*, 2017), observaram que o exercício voluntário só reduziu a formação de tumores no cólon quando realizado previamente ou durante o modelo químico com AOM, mas não com o exercício realizado após à exposição ao carcinógeno.

A heterogeneidade entre os estudos dificulta a comparação entre seus resultados. Essa heterogeneidade tem sua origem nas diferenças metodológicas do exercício como a modalidade de exercício, a duração do protocolo, o momento de aplicação do exercício, do próprio carcinógeno utilizado ou das espécies e linhagens utilizadas. No entanto, mesmo diante dessa heterogeneidade metodológica, percebe-se que o efeito inibitório do exercício regular se mantém contra a formação de FCAs e CAs.

O FCA é um reconhecido biomarcador de risco para câncer colorretal em humanos (SAKAI; TAKAHASHI; KATO; UCHIYAMA *et al.*, 2011). Contudo, 95% das CA se manifestam como lesões não-displásicas em humanos (TAKAYAMA; KATSUKI; TAKAHASHI; OHI *et al.*, 1998). Por outro lado, a maioria dos FDM encontrados em pacientes são identificados como lesões displásicas (FEMIA; CADERNI, 2008; SAKAI; MORIOKA; YAMADA; OHKUBO *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado em ratos que os FDM possuem maior frequência de mutações em *APC* e *β -catenina* e acúmulo de *β -catenina* no núcleo em comparação aos FCA (FEMIA; BENDINELLI; GIANNINI; SALVADORI *et al.*, 2005). Esses dados reforçam os FDM como uma lesão avançada e como

biomarcador para a predição de risco para câncer de cólon em modelos experimentais.

Entretanto, o FDM como biomarcador ainda não foi estudado no contexto de aplicação de exercício. Nossos dados são pioneiros em investigar essa relação. O exercício prévio inibiu por completo a formação de FDM ($p < 0,05$), enquanto o exercício concomitante atenuou sua incidência em 50% em comparação ao controle, mas de forma não significativa ($p > 0,05$). Ambos os momentos de exercício promoveram uma redução da multiplicidade de CDM em mais de 50%, mas da mesma forma que a análise sobre as CA, essas diferenças não foram significativas. A possível razão de não termos encontrado alterações significativas nessas análises se deve a heterogeneidade intra-grupo da formação dessas lesões e sua baixa multiplicidade (< 1 lesão por mm^2). Frente a isso, nosso trabalho acrescenta um dado relevante à literatura mostrando que o exercício (especialmente se realizado antes da exposição ao carcinógeno) inibe a formação de FDM no cólon, um marcador de lesão pré-neoplásica avançada com características moleculares similares à de tumores de cólon em camundongos e em humanos.

Tumores de cólon induzidos quimicamente por AOM apresentam mutações nos genes *KRAS* e *β -catenina* (PERŠE; CERAR, 2010). Essas mutações podem ser encontradas também em lesões pré-neoplásicas. As mutações em *KRAS* variam consideravelmente, tanto em tumores, quanto em lesões pré-neoplásicas (PERŠE; CERAR, 2010). Já as mutações em *β -catenina* estão presentes em até 77% dos adenocarcinomas formados por AOM e variam entre 15 e 25% das lesões pré-neoplásicas (TAKAHASHI; FUKUDA; SUGIMURA; WAKABAYASHI, 1998; TAKAHASHI; MUTOH; KAWAMORI; SUGIMURA *et al.*, 2000; YAMADA; YOSHIMI; HIROSE; KAWABATA *et al.*, 2000). Não há relatos na literatura sobre impacto do exercício na formação de mutações no DNA causados por carcinógenos químicos. No entanto, estudos sugerem que o exercício regular aumenta a capacidade do organismo de lidar com estresse oxidativo e genotóxico, o que teoricamente, resultaria em uma menor taxa de mutações (TRYFIDOU; MCCLEAN; NIKOLAIDIS; DAVISON, 2019).

Buscamos determinar se o exercício teria um impacto sobre a frequência dessas mutações no cólon, analisando regiões consideradas *hotspots* nesses

genes (códon 12 e 13 do *KRAS*; códon 32, 33, 34, 37 e 41 da *β-catenina*), mas não observamos a formação de mutações em nenhum dos grupos.

Não encontramos mutações em nenhum dos grupos possivelmente devido a uma limitação metodológica do nosso trabalho. Estudos que identificam mutações em *KRAS* e *β-catenina* em lesões pré-neoplásicas utilizam técnicas de coloração no tecido fresco para a identificação das lesões junto com análises em microscópio (PERŠE; CERAR, 2010). Depois de identificadas, as regiões de interesse no tecido são seccionadas e encaminhadas para a extração de DNA, garantindo uma maior proporção possível de lesões pré-neoplásicas no material que será sequenciado. Neste trabalho, não foi possível a utilização de tais técnicas em tecido fresco, logo, separamos longitudinalmente a parte distal do cólon em dois segmentos, um deles foi encaminhado para a histologia e o outro para as análises moleculares, dentre elas, o sequenciamento do DNA. Como vimos na análise histológica, a proporção de lesões em comparação às criptas normais era pequena (menos de uma lesão por mm² de tecido), reduzindo consideravelmente a chance de encontrarmos mutações ligadas ao DNA das criptas displásicas no *pool* de células encaminhadas para o sequenciamento.

No experimento II, nos perguntamos se o exercício estaria induzindo uma menor formação de lesões pré-cancerígenas através de mecanismos envolvidos desde a fase de iniciação tumoral. Para isso, direcionamos nossas análises para as fases agudas da exposição ao AOM. A iniciação da carcinogênese por AOM é promovida pela formação de danos no DNA. Predominantemente, esses danos são quebras-duplas do DNA causadas por adutos de O⁶MeG não reparados pela enzima MGMT (FAHRER; FRISCH; NAGEL; KRAUS *et al.*, 2015; FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D., 2012). O acúmulo de quebras-duplas forma focos de histonas H2AX fosforiladas (γH2AX), sendo este um marcador confiável para a identificação de quebras-duplas (MAH; EL-OSTA; KARAGIANNIS, 2010). De fato, a marcação de γH2AX no cólon se mostra correlacionada à formação de O⁶MeG após a aplicação de AOM. Por sua vez, a multiplicidade tumoral e a formação de O⁶MeG parecem aumentar proporcionalmente de acordo com a dose de AOM (FAHRER; FRISCH; NAGEL; KRAUS *et al.*, 2015).

Nossos dados demonstram que o exercício altera a dinâmica de dano e reparo colônico frente ao carcinógeno AOM. Vinte e quatro horas após a exposição ao AOM, os animais exercitados (EXAOM) apresentaram uma

formação cinco vezes menor de quebras-duplas no DNA em comparação ao grupo sedentário (AOM) ($p < 0,05$). A formação de quebras-duplas parece ter seu pico entre 24 e 48 horas após a aplicação de agentes alquilantes (ROOS; BAUMGARTNER; KAINA, 2004). Fahrer e colaboradores (2015) (FAHRER; FRISCH; NAGEL; KRAUS *et al.*, 2015) observaram em camundongos que os níveis de quebras-duplas começam a retornar ao nível basal somente 48 horas após a administração de AOM. Por outro lado, no presente estudo, os níveis de quebras-duplas nos animais exercitados retornam aos níveis basais em apenas 24 horas, sugerindo um efeito protetor do exercício contra o efeito genotóxico do AOM.

A cinética de expressão de *Mgmt* entre os grupos expostos ao AOM foi semelhante a observada na formação de quebras-duplas. Oito horas após a dose de AOM, observamos uma maior expressão de *Mgmt* em ambos os grupos tratados em comparação ao controle (59% em AOM, $p=0,089$; 48% em EXAOM, $p=0,046$). Porém, 24 horas após, a expressão de *Mgmt* seguiu aumentada somente no grupo AOM (69%, $p=0,002$), enquanto no grupo EXAOM essa expressão retornou aos níveis do controle. Comparando os dois grupos expostos ao AOM em 24 horas, vimos que a expressão de *Mgmt* era três vezes menor nos animais exercitados, apesar dessa diferença não ter sido significativa. Esses dados indicam que a menor expressão de *Mgmt* em 24 horas nos animais exercitados está possivelmente associada a menor prevalência de quebras-duplas (γ H2AX) no DNA desses animais. Essa associação está de acordo com Kim e colaboradores (KIM; DAVIDSON; ZOH; HENSEL; PATIL *et al.*, 2016). Os autores estabeleceram uma correlação direta entre a formação de quebras-duplas e a expressão de *Mgmt*, mostrando que a expressão desta enzima segue a necessidade de reparo na célula em 12 e 24 horas após uma dose de AOM. Um estudo observou um efeito similar com a suplementação de curcumina e/ou gordura poli-insaturada em animais expostos ao AOM. A suplementação promoveu uma menor formação de quebras-duplas do DNA induzidas pela exposição aguda ao AOM, o que foi correlacionado à menor expressão de *Mgmt* nos camundongos suplementados (KIM; DAVIDSON; ZOH; HENSEL; SALINAS *et al.*, 2016).

A prática regular de exercício favorece o aumento da atividade dos sistemas antioxidante e de reparo do DNA (SATO; NANRI; OHTA; KASAI *et al.*,

2003; SOARES; SILVA; OLIVEIRA; PEIXOTO *et al.*, 2015). Em comparação aos sedentários, indivíduos treinados apresentam uma maior expressão e atividade de enzimas antioxidantes (superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase) (GARCÍA-LÓPEZ; HÄKKINEN; CUEVAS; LIMA *et al.*, 2007; SOARES; SILVA; OLIVEIRA; PEIXOTO *et al.*, 2015) e enzimas de reparo do DNA (*MLH1* e *OGG1*, 8-oxoguanine DNA glycosylase) (ASAMI; HIRANO; YAMAGUCHI; ITOH *et al.*, 1998; SATO; NANRI; OHTA; KASAI *et al.*, 2003). Essas adaptações resultam na menor formação de 8-OH-dG (principal marcador dano oxidativo no DNA). A maior parte dos estudos investigaram essas adaptações em tecidos-alvo do exercício, como o músculo esquelético, tecido adiposo e também o sangue. Porém, estudos experimentais apontam que essas adaptações não são restritas a esses tecidos e que efeitos similares ocorrem de forma sistêmica. Duncan e colaboradores (1997) (DUNCAN; HARRIS; ARDIES, 1997), aplicaram 10 semanas de corrida em esteira em ratos e observaram o aumento da atividade das enzimas superóxido desmutase e catalase (enzimas antioxidantes) no pulmão. Nakatani e colaboradores (2005) (NAKATANI; KOMATSU; KATO; YAMANAKA *et al.*, 2005), entre ratos sedentários e ratos previamente exercitados (protocolo de natação de 10 semanas), compararam a resposta de reparo do DNA no rim seguida da exposição aguda à um carcinógeno renal. Uma hora após a aplicação do carcinógeno, observaram uma maior expressão da enzima antioxidante superóxido desmutase no rim dos animais exercitados, o que suprimiu significativamente a formação do 8-OH-dG no rim desses animais. Estes estudos sugerem que o exercício físico pode reduzir a formação de danos no DNA através de uma maior ação desmutagênica no tecido, ou seja, reduzindo a interação de agentes mutagênicos com o DNA e/ou através de uma maior eficiência dos sistemas de reparo do DNA.

A deficiência do reparo por *mismatch* (MMR) provoca mutações pontuais no genoma, causando a chamada instabilidade de microssatélite (MSI) (BOLAND; GOEL, 2010). Em humanos, a MSI se manifesta em 15% dos tumores colorretais esporádicos, sendo a principal característica dos tumores hereditários da síndrome de Lynch (COLUSSI; BRANDI; BAZZOLI; RICCIARDIELLO, 2013). Nos tumores colorretais esporádicos em humanos, 40% dos casos de MSI se manifestam através da inativação de *MLH1* pela hipermetilação de sua região promotora (KUISMANEN; HOLMBERG; SALOVAARA; DE LA CHAPELLE *et al.*,

2000; THOMPSON; SPURDLE; PLAZZER; GREENBLATT *et al.*, 2014). Ainda não está claro o papel do *Mlh1* na formação de tumores induzidos quimicamente (GUDA; UPENDER; BELINSKY; FLYNN *et al.*, 2004). A MSI não é uma característica frequente em tumores formados por AOM (LUCERI; DE FILIPPO; CADERNI; GAMBACCIANI *et al.*, 2000; WALCHLE; DIWAN; SHIAO; CALVERT, 1999). Contudo, linhagens de camundongos com mutação *null* heterozigota em *MLH1* (*MLH1*^{-/-}) ganham uma pré-disposição à tumores no trato gastrointestinal, além de aumentar em três vezes a formação de adenomas intestinais em linhagens com mutação germinativa *nonsense* no gene *APC* (*Apc*^{Min+}) (EDELMANN; YANG; KURAGUCHI; HEYER *et al.*, 1999; SHOEMAKER; HAIGIS; BAKER; DUDLEY *et al.*, 2000). Em nosso modelo, não observamos nenhuma alteração de expressão gênica de *Mlh1* em resposta à dose de AOM ou ao exercício, o que está de acordo com os achados (LUCERI; DE FILIPPO; CADERNI; GAMBACCIANI *et al.*, 2000; WALCHLE; DIWAN; SHIAO; CALVERT, 1999) sobre a relativa independência do modelo pelas vias de MSI.

Evidências em animais e em humanos mostram uma crescente interdependência entre epigenética e a regulação do exercício em processos como inflamação e envelhecimento, assim como na prevenção de doenças metabólicas, neuro-degenerativas e do câncer (FERIOLI; ZAULI; MAIORANO; MILANI *et al.*, 2019; GRAZIOLI; DIMAURO; MERCATELLI; WANG *et al.*, 2017).

A hipometilação global é uma anormalidade epigenética associada às etapas iniciais da carcinogênese, promovendo instabilidade genômica pelo aumento da atividade de regiões normalmente metiladas (sequências repetitivas, como os elementos transponíveis e retrotransponíveis) (JURKA; KAPITONOV; KOHANY; JURKA, 2007; SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Modelos químicos baseados na administração crônica de AOM induzem uma hipometilação global no tecido do cólon, fator que contribui na formação dos tumores (BORINSTEIN; CONERLY; DZIECIATKOWSKI; BISWAS *et al.*, 2010). No nosso experimento, analisamos o efeito imediato de uma dose de AOM e observamos uma tendência de aumento nos níveis de metilação global por *Line-1* tanto em 8 quanto em 24 horas, independente da presença ou ausência do exercício. Essa tendência de aumento na metilação global ocorreu em todos os grupos tratados, embora só tenha sido significativo no grupo AOM (sedentário) em 8 horas ($p < 0,05$). A exposição crônica ao AOM resulta na hipometilação global do DNA das células

colônicas, evento possivelmente relacionado a promoção tumoral nesse modelo (BORINSTEIN; CONERLY; DZIECIATKOWSKI; BISWAS *et al.*, 2010). Nossos resultados, por outro lado, se referem a resposta aguda do tecido à uma dose única de AOM, um efeito ainda não esclarecido na literatura.

Entre os grupos controles, o protocolo de natação não teve impacto sob os níveis de *Line-1* do DNA das células do cólon. A maioria dos trabalhos mostram que o exercício promove maiores níveis de metilação global em diferentes tecidos, mas no cólon essa relação não havia sido descrita. Indivíduos que se exercitavam entre 26 e 30 minutos/dia apresentaram um maior nível de metilação global em leucócitos sanguíneos em comparação a indivíduos que realizavam 10 ou menos minutos/dia (ZHANG; CARDARELLI; CARROLL; ZHANG *et al.*, 2011). Boyne e colaboradores (2018) (BOYNE; O'SULLIVAN; OLIJ; KING *et al.*, 2018) em uma meta-análise, observaram que a prática regular de exercício reduziu o risco de câncer de mama em associação à indução de maiores níveis de metilação global. Em ratos, um protocolo de exercício induziu maiores níveis de metilação global no hipotálamo (KASHIMOTO; TOFFOLI; MANFREDO; VOLPINI *et al.*, 2016). Nesse mesmo trabalho, em animais expostos à um modelo de estresse crônico, o exercício manteve a metilação global no hipocampo e no córtex, enquanto os animais sedentários apresentaram menores níveis de metilação global em resposta ao estresse.

Como mencionado acima, a prática de exercício parece estar associada à maiores níveis de metilação global (WHITE; SANDLER; BOLICK; XU *et al.*, 2013; ZHANG; CARDARELLI; CARROLL; ZHANG *et al.*, 2011). Contudo, quando se analisa o impacto do exercício sobre a metilação de genes específicos, vemos que essa regulação é mais complexa e não se limita à hipermetilação ou desmetilação global, variando de acordo com o gene e com o tecido (BARRÓN-CABRERA; RAMOS-LOPEZ; GONZÁLEZ-BECERRA; RIEZU-BOJ *et al.*, 2019; DENHAM; O'BRIEN; MARQUES; CHARCHAR, 2015). No hipocampo de camundongos, o exercício regular promoveu uma maior expressão de *BDNF* (*brain derived neurotrophic fator*) por meio da hipometilação da sua região promotora (GOMEZ-PINILLA; ZHUANG; FENG; YING *et al.*, 2011). A prática de exercício foi associada a menores níveis de metilação dos genes supressores de tumor *APC* e *RASSF1A* em tecido mamário de mulheres sem câncer e também com menores níveis de metilação de *CACNA2D3*

(*Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2 Delta3*, gene supressor tumoral) em pacientes com carcinoma gástrico (COYLE; XIE; LEWIS; BU *et al.*, 2007; YUASA; NAGASAKI; AKIYAMA; HASHIMOTO *et al.*, 2009). Em pacientes com câncer de mama, um protocolo de exercício aeróbio reduziu os níveis de metilação do gene *L3MBTL1*, um gene supressor de tumor, cuja hipermetilação foi associada a um pior prognóstico (ZENG; IRWIN; LU; RISCH *et al.*, 2012). Bryan e colaboradores (2013), (BRYAN; MAGNAN; HOOPER; HARLAAR *et al.*, 2013) após um ano de intervenção de exercício em indivíduos saudáveis, analisaram na saliva, a metilação global do DNA e de 45 sítios CpG de genes associados ao câncer de mama. Os autores observaram que o exercício induziu maiores níveis de metilação global, mas, ao mesmo tempo, uma hipometilação no painel de genes específicos, dentre eles os supressores de tumor *BRCA1*, *BRCA2* e *RUNX3* (*BRCA 1 e 2 DNA repair associated* e *RUNX family transcription factor 3, respectativa*). Esses achados sugerem que a prática de exercício promove um perfil de metilação anti-tumoral, que possivelmente atua na prevenção e no controle do câncer.

A hipermetilação da região promotora de *MGMT* e a perda de sua expressão é um evento presente em alguns tumores humanos (ESTELLER; HAMILTON; BURGER; BAYLIN *et al.*, 1999). Em tumores colorretais, essa metilação aberrante em *MGMT* é associada a maior frequência de mutação (G para A) em genes relevantes para a carcinogênese como *KRAS*, *TP53* e *PIK3CA* (ESTELLER; RISQUES; TOYOTA; CAPELLA *et al.*, 2001; ESTELLER; TOYOTA; SANCHEZ-CESPEDES; CAPELLA *et al.*, 2000; SHIMA; MORIKAWA; BABA; NOSHO *et al.*, 2011). A associação entre a hipermetilação do promotor de *MGMT* e mutações em *KRAS* também foi encontrada em adenomas pequenos no cólon e até em FCA (ESTELLER; TOYOTA; SANCHEZ-CESPEDES; CAPELLA *et al.*, 2000; MENIGATTI; PEDRONI; VERRONE; BORGHI *et al.*, 2007). Modelos *in vivo*, como o utilizado neste estudo com administração de AOM, não induzem hipermetilação de *MGMT* como em humanos (BORINSTEIN; CONERLY; DZIECIATKOWSKI; BISWAS *et al.*, 2010), mas sua importância na prevenção de tumores se mantém, pois, a perda da sua atividade é associada a maior suscetibilidade à formação de tumores por AOM.

Identificamos em nosso trabalho, que os animais exercitados (EX) apresentaram maiores níveis de metilação na região promotora de *Mgmt* em

comparação aos sedentários (CON). No entanto, essa hipermetilação não induziu uma menor expressão gênica de *Mgmt* no grupo EX. Essa contradição pode ser explicada, pela possibilidade da área gênica analisada (3 sítios CpG) não representar o *status* real de metilação da região promotora do gene. Além disto, outros mecanismos epigenéticos não analisados podem estar envolvidos na regulação da expressão gênica de *Mgmt*, como a modificação de histonas e/ou expressão de miRNAs.

Em seguida, analisamos os níveis de metilação da região promotora de *Mgmt* após a dose única de AOM. Observamos que o AOM elevou a metilação de *Mgmt* em 24 horas nos animais sedentários ($p=0,043$). Por outro lado, o exercício tende a anular esse efeito hipermetilante do AOM sobre a região promotora de *Mgmt* em 24 horas. Vimos um aumento na metilação de *Mgmt* pelo AOM agudo, mas segundo a literatura, sua aplicação crônica não promove alterações a longo prazo sobre o *status* de metilação de *Mgmt* (BORINSTEIN; CONERLY; DZIECIATKOWSKI; BISWAS *et al.*, 2010). Observamos um aumento tanto da expressão de *Mgmt* quanto da metilação de seu promotor induzido pela administração de AOM, no entanto, não foi possível testar a correlação entre esses dados.

Ainda não está claro de que forma o exercício promove alterações epigenéticas. Alguns estudos mostram que essa regulação deve pela capacidade do exercício de regular a expressão e atividade de enzimas da maquinaria epigenética (FERIOLI; ZAULI; MAIORANO; MILANI *et al.*, 2019). Por isso, analisamos a expressão de enzimas da maquinaria de metilação e desmetilação do DNA em resposta ao exercício e a administração de AOM. A exposição à uma dose de AOM não alterou a expressão da maquinaria epigenética no cólon. Porém, o exercício foi uma variável determinante. O exercício físico induziu uma maior expressão basal de *Dnmt3a* (66%, $p=0,089$) e uma menor expressão de *Apobec3* (3 vezes, $p<0,0001$) quando comparado ao controle sedentário. Essas alterações apontam para um fenótipo metilador do DNA induzido pelo exercício, mas como vimos, isso não resultou em alterações nos níveis de metilação global. Não houve correlação entre a expressão de *Dnmt3a* e *Apobec3* com os maiores níveis de metilação de *Mgmt* encontrados nos animais exercitados (Figura Suplementar 8.2).

O impacto do exercício sobre a maquinaria epigenética já havia sido observado em outros tecidos (especialmente no sistema nervoso central), mas até então, não no tecido intestinal. No presente estudo não pudemos relacionar as alterações na maquinaria epigenética no cólon com o efeito preventivo do exercício. No entanto, segundo a literatura, a regulação do exercício sobre a maquinaria epigenética parece desempenhar efeitos terapêuticos no tecido nervoso, como a atenuação do declínio neurológico pelo envelhecimento (JESSOP; TOLEDO-RODRIGUEZ, 2018; LOVATEL; ELSNER; BERTOLDI; VANZELLA *et al.*, 2013). Estudos em fase pré-clínica sugerem que o efeito neuro-protetor do exercício está associado a manutenção da atividade da *Tet1* e *Tet2* (*Ten-Eleven translocations*), enzimas desmetiladoras do DNA que apresentam queda de expressão com envelhecimento (JESSOP; TOLEDO-RODRIGUEZ, 2018; ZHANG; LI; ZHU; MIAO *et al.*, 2020). No cólon, entretanto, o protocolo de exercício utilizado neste estudo não alterou a expressão de *Tet2*.

O efeito do exercício sobre a expressão de *Dnmts* não é homogêneo entre os tecidos, e o comportamento dessa enzima parece aumentar somente após a sessão aguda de exercício (CECHINEL; BASSO; BERTOLDI; SCHALLENBERGER *et al.*, 2016; ELSNER; LOVATEL; MOYSÉS; BERTOLDI *et al.*, 2013). Por outro lado, nosso estudo, empregando um modelo crônico de natação observou uma tendência a aumento, não significativo (66%, $p=0,089$), da expressão de *Dnmt3a* no cólon. Em resposta a uma sessão de corrida em esteira, estudos observaram o aumento agudo da expressão de *Dnmt1* no hipocampo e de *Dnmt3b* no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos (CECHINEL; BASSO; BERTOLDI; SCHALLENBERGER *et al.*, 2016; ELSNER; LOVATEL; MOYSÉS; BERTOLDI *et al.*, 2013). Contudo, nesses trabalhos, modelos crônicos de exercício não promoveram nenhum efeito sobre a expressão basal das *DNMTs*. Em humanos, uma sessão de corrida em esteira resultou na diminuição da concentração nuclear proteica de *Dnmt3b* nas células do sangue, mas nenhuma alteração da *Dnmt3a* foi observada (HORSBURGH; TODRYK; TOMS; MORAN *et al.*, 2015). Toffoli e colaboradores (2017) (TOFFOLI; VOLPINI; NASCIMENTO; SILVA *et al.*, 2017) mostram que em situação normal o exercício regular não induziu alterações sobre a expressão basal das *Dnmts* no pulmão, mas alterou sua expressão em resposta a situações

de estresse por restrição de mobilidade, inibindo alterações no perfil de metilação ligadas ao estresse.

A carga mutacional encontrada em tumores é um produto de múltiplas fontes genotóxicas, endógenas e exógenas (JARVIS; EBRAHIMI; TEMIZ; HARRIS, 2018). O foco deste trabalho foi analisar o efeito carcinogênico de agentes alquilantes provenientes da metabolização do AOM e a ação do exercício como um fator protetor sobre o DNA. Entretanto, nossos dados são pioneiros em demonstrar uma menor expressão de *ApoBec3* no cólon induzida pelo exercício, o que expandiu nossa atenção para a possível atenuação do exercício sobre outras fontes de mutações. A desaminação de citosinas no DNA é uma fonte de mutações presente em diferentes tumores. Essa desaminação é feita pela família de enzimas APOBEC, responsável por duas assinaturas mutacionais descritas em tumores humanos (assinaturas 2 e 13) (ALEXANDROV; NIK-ZAINAL; WEDGE; APARICIO *et al.*, 2013). A assinatura 2 da APOBEC é uma das mais frequentes em tumores, ficando somente atrás de assinaturas relacionadas ao envelhecimento. A *APOBEC3B* é super-expressa em diversos tumores e até então é a enzima associada às assinaturas mutacionais de APOBEC em humanos (SWANTON; MCGRANAHAN; STARRETT; HARRIS, 2015). As assinaturas de APOBEC não são comuns em tumores colorretais, mas nosso resultado abre a discussão se o exercício poderia obter efeitos anti-tumorais diminuindo a expressão de *APOBECs* em outros tecidos como em mama, pulmão, cabeça e pescoço, bexiga e outros onde a assinatura de APOBEC é mais frequente (ALEXANDROV; NIK-ZAINAL; WEDGE; APARICIO *et al.*, 2013).

Nossos dados trazem uma abordagem epigenética sobre os efeitos anti-tumorais do exercício a partir das fases iniciais da carcinogênese de cólon. Contudo, julgamos como a principal limitação do nosso estudo, o tamanho amostral dos grupos tratados com uma única dose de AOM (experimento II). Modelos animais isogênicos também apresentam heterogeneidade intra-grupo. Ao dividir a eutanásia dos animais em 8 e 24 horas pós-dose de AOM, reduzimos o número de animais por grupo, inviabilizando a confiança nas análises de correlação entre os mesmos. O baixo número de animais nesses grupos também limitou a interpretação das análises em parâmetros com maior heterogeneidade intra-grupo.

Mesmo com suas limitações, este trabalho mostrou novos *insights* acerca do efeito do exercício nas fases de iniciação tumoral do cólon. A análise integrada da atuação do exercício físico sobre as fases de iniciação e promoção tumoral é inédita e nos sugere que ao antagonizar mecanismos de iniciação tumoral, o engajamento regular à prática de exercícios físicos desencadeia um efeito preventivo sobre a tumorigênese do cólon. Porém, mais estudos são necessários para compreendermos mais profundamente a interação do exercício com o sistema de reparo do DNA no cólon. Ainda, análises de metiloma em um contexto de exercício e carcinogênese seriam de grande utilidade em esclarecer o possível papel da epigenética nos efeitos anti-tumorais do exercício.

6. CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÃO PRINCIPAL

O protocolo de exercício aeróbio, em particular quando realizado antes da exposição crônica ao carcinógeno, preveniu a formação de lesões pré-neoplásicas no cólon. Observamos que o exercício físico pode atuar na prevenção dessas lesões por desencadear uma proteção do tecido do cólon contra formação de dano do DNA induzida pelos insultos genotóxicos gerados pelo carcinógeno, favorecendo assim, mecanismos anti-tumorais no cólon desde a fase de iniciação tumoral.

6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

O protocolo de natação realizado antes da exposição crônica ao AOM induziu uma menor incidência de FDM no cólon dos animais.

Os animais exercitados apresentaram menor formação de quebras-duplas do DNA no cólon 24 horas após a dose de AOM em comparação aos animais não-exercitados.

Os animais exercitados apresentaram maiores níveis basais de metilação da região promotora de *Mgmt* no cólon em comparação aos não-exercitados, no entanto, esse fenômeno não resultou em alterações na sua expressão gênica.

O protocolo de exercício induziu uma maior expressão gênica basal de *Dnmt3a* e uma menor expressão gênica basal de *Apobec3* no cólon.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAR, L.; VIEIRA, A. R.; AUNE, D.; SOBIECKI, J. G. *et al.* Height and body fatness and colorectal cancer risk: an update of the WCRF–AICR systematic review of published prospective studies. **European journal of nutrition**, 57, n. 5, p. 1701-1720, 2018.

ABEL, J. L.; RISSMAN, E. F. Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain. **Int J Dev Neurosci**, 31, n. 6, p. 382-390, Oct 2013.

AINSWORTH, B. E.; HASKELL, W. L.; WHITT, M. C.; IRWIN, M. L. *et al.* Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. **Medicine & science in sports & exercise**, 32, n. 9, p. S498-S516, 2000.

ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S. A. *et al.* Erratum: Signatures of mutational processes in human cancer (Nature (2013) 500 (415-421). **Nature**, 502, n. 7470, p. 258, 2013.

ANDERSON, E.; DURSTINE, J. L. Physical activity, exercise, and chronic diseases: A brief review. **Sports Medicine and Health Science**, 1, n. 1, p. 3-10, 2019.

ANDRIANOPOULOS, G.; NELSON, R. L.; BOMBECK, C. T.; SOUZA, G. The influence of physical activity in 1,2 dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in the rat. **Anticancer Res**, 7, n. 4B, p. 849-852, 1987 Jul-Aug 1987.

AOI, W.; NAITO, Y.; TAKAGI, T.; KOKURA, S. *et al.* Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS. **Biochemical and biophysical research communications**, 399, n. 1, p. 14-19, 2010.

AOI, W.; NAITO, Y.; TAKAGI, T.; TANIMURA, Y. *et al.* A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. **Gut**, 62, n. 6, p. 882-889, 2013.

ARNOLD, M.; SIERRA, M. S.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, 66, n. 4, p. 683-691, 04 2017.

ASAMI, S.; HIRANO, T.; YAMAGUCHI, R.; ITOH, H. *et al.* Reduction of 8-hydroxyguanine in human leukocyte DNA by physical exercise. **Free Radic Res**, 29, n. 6, p. 581-584, Dec 1998.

ASHCRAFT, K. A.; PEACE, R. M.; BETOF, A. S.; DEWHIRST, M. W. *et al.* Efficacy and Mechanisms of Aerobic Exercise on Cancer Initiation, Progression, and Metastasis: A Critical Systematic Review of In Vivo Preclinical Data. **Cancer Res**, 76, n. 14, p. 4032-4050, 07 2016.

ASSI, M.; DUFRESNE, S.; RÉBILLARD, A. Exercise shapes redox signaling in cancer. **Redox Biology**, p. 101439, 2020.

BALLARD-BARBASH, R.; SCHATZKIN, A.; ALBANES, D.; SCHIFFMAN, M. H. *et al.* Physical activity and risk of large bowel cancer in the Framingham Study. **Cancer Research**, 50, n. 12, p. 3610-3613, 1990.

BAMES, J.; BEHRENS, T. K.; BENDEN, M. E.; BIDDLE, S. *et al.* Letter to the Editor: Standardized use of the terms "sedentary" and "sedentary behaviours". **Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme**, 37, p. 540-542, 2012.

BARRÓN-CABRERA, E.; RAMOS-LOPEZ, O.; GONZÁLEZ-BECERRA, K.; RIEZU-BOJ, J. I. *et al.* Epigenetic Modifications as Outcomes of Exercise Interventions Related to Specific Metabolic Alterations: A Systematic Review. **Lifestyle genomics**, 12, n. 1-6, p. 25-44, 2019.

BECKER, K.; GREGEL, C.; FRICKE, C.; KOMITOWSKI, D. *et al.* DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced conversion of benign into malignant tumors. **Carcinogenesis**, 24, n. 3, p. 541-546, Mar 2003.

BETOF, A. S.; LASCOLA, C. D.; WEITZEL, D.; LANDON, C. *et al.* Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. **J Natl Cancer Inst**, 107, n. 5, May 2015.

BILSKI, J.; MAZUR-BIALY, A.; BRZOZOWSKI, B.; MAGIEROWSKI, M. *et al.* Can exercise affect the course of inflammatory bowel disease? Experimental and clinical evidence. **Pharmacol Rep**, 68, n. 4, p. 827-836, Aug 2016.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer letters**, 37, n. 2, p. 147-151, 1987.

BOHANNON, R. W. Muscle strength: clinical and prognostic value of hand-grip dynamometry. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, 18, n. 5, p. 465-470, 2015.

BOLAND, C. R.; GOEL, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology**, 138, n. 6, p. 2073-2087. e2073, 2010.

BORINSTEIN, S. C.; CONERLY, M.; DZIECIATKOWSKI, S.; BISWAS, S. *et al.* Aberrant DNA methylation occurs in colon neoplasms arising in the azoxymethane colon cancer model. **Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center**, 49, n. 1, p. 94-103, 2010.

BOYLE, T.; KEEGEL, T.; BULL, F.; HEYWORTH, J. *et al.* Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst**, 104, n. 20, p. 1548-1561, Oct 2012.

BOYNE, D. J.; O'SULLIVAN, D. E.; OLIJ, B. F.; KING, W. D. *et al.* Physical activity, global DNA methylation, and breast cancer risk: a systematic literature review and meta-analysis. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 27, n. 11, p. 1320-1331, 2018.

BRAY, F. Transitions in human development and the global cancer burden. **World cancer report**, p. 54-68, 2014.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018.

BRYAN, A. D.; MAGNAN, R. E.; HOOPER, A. E. C.; HARLAAR, N. *et al.* Physical activity and differential methylation of breast cancer genes assayed from saliva: a preliminary investigation. **Annals of Behavioral Medicine**, 45, n. 1, p. 89-98, 2013.

BUGNI, J. M.; MEIRA, L. B.; SAMSON, L. D. Alkylation-induced colon tumorigenesis in mice deficient in the Mgmt and Msh6 proteins. **Oncogene**, 28, n. 5, p. 734-741, Feb 2009.

BYERS, T.; NESTLE, M.; MCTIERNAN, A.; DOYLE, C. *et al.* American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 52, n. 2, p. 92-119, 2002.

CADERNI, G.; FEMIA, A. P.; GIANNINI, A.; FAVUZZA, A. *et al.* Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. **Cancer Research**, 63, n. 10, p. 2388-2392, 2003.

CAMPBELL, K. L.; WINTERS-STONE, K. M.; WISKEMANN, J.; MAY, A. M. *et al.* Exercise guidelines for cancer survivors: consensus statement from international

multidisciplinary roundtable. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 51, n. 11, p. 2375-2390, 2019.

CAMUZI, D.; DE AMORIM, Í. S. S.; RIBEIRO PINTO, L. F.; OLIVEIRA TRIVILIN, L. *et al.* Regulation is in the air: the relationship between hypoxia and epigenetics in cancer. **Cells**, 8, n. 4, p. 300, 2019.

CECHINEL, L. R.; BASSO, C. G.; BERTOLDI, K.; SCHALLENBERGER, B. *et al.* Treadmill exercise induces age and protocol-dependent epigenetic changes in prefrontal cortex of Wistar rats. **Behavioural brain research**, 313, p. 82-87, 2016.

CHAO, A.; CONNELL, C. J.; JACOBS, E. J.; MCCULLOUGH, M. L. *et al.* Amount, type, and timing of recreational physical activity in relation to colon and rectal cancer in older adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 13, n. 12, p. 2187-2195, 2004.

CHAO, A.; CONNELL, C. J.; JACOBS, E. J.; MCCULLOUGH, M. L. *et al.* Amount, type, and timing of recreational physical activity in relation to colon and rectal cancer in older adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 13, n. 12, p. 2187-2195, Dec 2004.

CHEN, J.; HUANG, X.-F. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. **Cancer biology & therapy**, 8, n. 14, p. 1313-1317, 2009.

CHEN, X.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; XIE, Q. *et al.* Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 38 cohort studies in 45 study reports. **Value in Health**, 22, n. 1, p. 104-128, 2019.

CLINTON, S. K.; GIOVANNUCCI, E. L.; HURSTING, S. 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**, 150, n. 4, p. 663-671, 2020.

COLUSSI, D.; BRANDI, G.; BAZZOLI, F.; RICCIARDIELLO, L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. **International journal of molecular sciences**, 14, n. 8, p. 16365-16385, 2013.

CORMIE, P.; ZOPF, E. M.; ZHANG, X.; SCHMITZ, K. H. The impact of exercise on cancer mortality, recurrence, and treatment-related adverse effects. **Epidemiologic reviews**, 39, n. 1, p. 71-92, 2017.

CORPET, D. E.; PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **European Journal of Cancer**, 41, n. 13, p. 1911-1922, 2005.

COYLE, Y. M.; XIE, X. J.; LEWIS, C. M.; BU, D. *et al.* Role of physical activity in modulating breast cancer risk as defined by APC and RASSF1A promoter hypermethylation in nonmalignant breast tissue. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 16, n. 2, p. 192-196, Feb 2007.

CUYÀS, E.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; VERDURA, S.; GARCÍA, R. Á.-F. *et al.* Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism. **Oncogene**, 37, n. 7, p. 963-970, 2018.

DENHAM, J.; O'BRIEN, B. J.; MARQUES, F. Z.; CHARCHAR, F. J. Changes in the leukocyte methylome and its effect on cardiovascular-related genes after exercise. **Journal of Applied Physiology**, 118, n. 4, p. 475-488, 2015.

DI GREGORIO, C.; LOSI, L.; FANTE, R.; MODICA, S. *et al.* Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathology**, 30, n. 4, p. 328-334, 1997.

DING, D.; LAWSON, K. D.; KOLBE-ALEXANDER, T. L.; FINKELSTEIN, E. A. *et al.* The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. **The Lancet**, 388, n. 10051, p. 1311-1324, 2016.

DONG, Y.; ZHOU, J.; ZHU, Y.; LUO, L. *et al.* Abdominal obesity and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Bioscience reports**, 37, n. 6, 2017.

DUNCAN, K.; HARRIS, S.; ARDIES, C. M. Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. **Cancer Lett**, 116, n. 2, p. 151-158, Jun 1997.

EDELMANN, W.; YANG, K.; KURAGUCHI, M.; HEYER, J. *et al.* Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. **Cancer research**, 59, n. 6, p. 1301-1307, 1999.

ELSNER, V. R.; LOVATEL, G. A.; MOYSÉS, F.; BERTOLDI, K. *et al.* Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. **Experimental gerontology**, 48, n. 2, p. 136-139, 2013.

ESTELLER, M.; HAMILTON, S. R.; BURGER, P. C.; BAYLIN, S. B. *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase

by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer research**, 59, n. 4, p. 793-797, 1999.

ESTELLER, M.; RISQUES, R.-A.; TOYOTA, M.; CAPELLA, G. *et al.* Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G: C to A: T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. **Cancer Research**, 61, n. 12, p. 4689-4692, 2001.

ESTELLER, M.; TOYOTA, M.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; CAPELLA, G. *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. **Cancer research**, 60, n. 9, p. 2368-2371, 2000.

FAHRER, J.; FRISCH, J.; NAGEL, G.; KRAUS, A. *et al.* DNA repair by MGMT, but not AAG, causes a threshold in alkylation-induced colorectal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 36, n. 10, p. 1235-1244, 2015.

FANG, Q.; KANUGULA, S.; PEGG, A. E. Function of domains of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Biochemistry**, 44, n. 46, p. 15396-15405, Nov 2005.

FEDIRKO, V.; TRAMACERE, I.; BAGNARDI, V.; ROTA, M. *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. **Annals of oncology**, 22, n. 9, p. 1958-1972, 2011.

FEMIA, A. P.; BENDINELLI, B.; GIANNINI, A.; SALVADORI, M. *et al.* Mucin-depleted foci have β -catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose-and time-dependent in the colon of 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats. **International journal of cancer**, 116, n. 1, p. 9-15, 2005.

FEMIA, A. P.; CADERNI, G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. **Planta medica**, 74, n. 13, p. 1602-1607, 2008.

FENG, Z.; HU, W.; TANG, M. S. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 23, p. 8598-8602, Jun 2004.

FERIOLI, M.; ZAULI, G.; MAIORANO, P.; MILANI, D. *et al.* Role of physical exercise in the regulation of epigenetic mechanisms in inflammation, cancer, neurodegenerative diseases, and aging process. **Journal of cellular physiology**, 234, n. 9, p. 14852-14864, 2019.

FERNANDES, C.; MARINI, T.; FRAJACOMO, F. T. T.; JORDAO, A. *et al.* Frequency and duration modulate anticarcinogenic effects of a physical training in the colon. **International journal of sports medicine**, 36, n. 09, p. 710-715, 2015.

FIALA, E. S.; KULAKIS, C.; BOBOTAS, G.; WEISBURGER, J. H. Detection and estimation of azomethane in expired air of l, 2-dimethylhydrazine-treated rats. **Journal of the National Cancer Institute**, 56, n. 6, p. 1271-1273, 1976.

FIDLER, M. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. **Int J Cancer**, 139, n. 11, p. 2436-2446, 12 2016.

FLEG, J. L.; PINA, I. L.; BALADY, G. J.; CHAITMAN, B. R. *et al.* Assessment of functional capacity in clinical and research applications: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. **Circulation**, 102, n. 13, p. 1591-1597, 2000.

FOROUZANFAR, M. H.; AFSHIN, A.; ALEXANDER, L. T.; ANDERSON, H. R. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The lancet**, 388, n. 10053, p. 1659-1724, 2016.

FRAJACOMO, F. T.; KANNEN, V.; DEMINICE, R.; GERALDINO, T. H. *et al.* Aerobic training activates interleukin 10 for colon anticarcinogenic effects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 47, n. 9, p. 1806-1813, 2015.

FREDRIKSSON, M.; BENGTSSON, N. O.; HARDELL, L.; AXELSON, O. Colon cancer, physical activity, and occupational exposures. A case-control study. **Cancer**, 63, n. 9, p. 1838-1842, 1989.

FRISCH, R. E.; WYSHAK, G.; ALBRIGHT, N.; ALBRIGHT, T. *et al.* Lower prevalence of breast cancer and cancers of the reproductive system among former college athletes compared to non-athletes. **British Journal of Cancer**, 52, n. 6, p. 885-891, 1985.

FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, 12, n. 2, p. 104-120, 2012.

FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nat Rev Cancer**, 12, n. 2, p. 104-120, Jan 2012.

FUKU, N.; OCHIAI, M.; TERADA, S.; FUJIMOTO, E. *et al.* Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. **Med Sci Sports Exerc**, 39, n. 1, p. 70-74, Jan 2007.

GAO, Z.; GUO, B.; GAO, R.; ZHU, Q. *et al.* Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. **Frontiers in microbiology**, 6, p. 20, 2015.

GARABRANT, D. H.; PETERS, J. M.; MACK, T. M.; BERNSTEIN, L. Job activity and colon cancer risk. **American journal of epidemiology**, 119, n. 6, p. 1005-1014, 1984.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A. *et al.* Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 43, n. 7, p. 1334-1359, 2011.

GARCÍA-LÓPEZ, D.; HÄKKINEN, K.; CUEVAS, M.; LIMA, E. *et al.* Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 17, n. 5, p. 595-604, 2007.

GOMEZ-PINILLA, F.; ZHUANG, Y.; FENG, J.; YING, Z. *et al.* Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. **European Journal of Neuroscience**, 33, n. 3, p. 383-390, 2011.

GRAZIOLI, E.; DIMAURO, I.; MERCATELLI, N.; WANG, G. *et al.* Physical activity in the prevention of human diseases: role of epigenetic modifications. **BMC genomics**, 18, n. 8, p. 802, 2017.

GUDA, K.; UPENDER, M. B.; BELINSKY, G.; FLYNN, C. *et al.* Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability. **Oncogene**, 23, n. 21, p. 3813-3821, 2004.

GUTHOLD, R.; STEVENS, G. A.; RILEY, L. M.; BULL, F. C. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1·9 million participants. **The Lancet Global Health**, 6, n. 10, p. e1077-e1086, 2018.

HANSEN, I. O.; JESS, P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer-a systematic review. **Dan Med J**, 59, n. 6, p. A4444, 2012.

HARRISS, D. J.; ATKINSON, G.; BATTERHAM, A.; GEORGE, K. *et al.* Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity. **Colorectal Dis**, 11, n. 7, p. 689-701, Sep 2009.

HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M. J.; ZIERATH, J. R. Integrative biology of exercise. **Cell**, 159, n. 4, p. 738-749, 2014.

HELDENS, A.; BONGERS, B.; LENSSEN, A.; STASSEN, L. *et al.* The association between performance parameters of physical fitness and postoperative outcomes in patients undergoing colorectal surgery: an evaluation of care data. **European Journal of Surgical Oncology**, 43, n. 11, p. 2084-2092, 2017.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B. D. *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the national academy of sciences**, 93, n. 18, p. 9821-9826, 1996.

HIDAYAT, K.; ZHOU, H.-J.; SHI, B.-M. Influence of physical activity at a young age and lifetime physical activity on the risks of 3 obesity-related cancers: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Nutrition Reviews**, 78, n. 1, p. 1-18, 2020.

HOFFMAN-GOETZ, L.; PERVAIZ, N.; PACKER, N.; GUAN, J. Freewheel training decreases pro- and increases anti-inflammatory cytokine expression in mouse intestinal lymphocytes. **Brain Behav Immun**, 24, n. 7, p. 1105-1115, Oct 2010.

HOFMANN, P. Cancer and Exercise: Warburg Hypothesis, Tumour Metabolism and High-Intensity Anaerobic Exercise. **Sports (Basel)**, 6, n. 1, Jan 2018.

HOJMAN, P.; DETHLEFSEN, C.; BRANDT, C.; HANSEN, J. *et al.* Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 301, n. 3, p. E504-510, Sep 2011.

HOJMAN, P.; GEHL, J.; CHRISTENSEN, J. F.; PEDERSEN, B. K. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. **Cell Metab**, 27, n. 1, p. 10-21, 01 2018.

HONG, S.; CAI, Q.; CHEN, D.; ZHU, W. *et al.* Abdominal obesity and the risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. **European Journal of Cancer Prevention**, 21, n. 6, p. 523-531, 2012

HORSBURGH, S.; TODRYK, S.; TOMS, C.; MORAN, C. N. *et al.* Exercise-conditioned plasma attenuates nuclear concentrations of DNA methyltransferase 3B in human peripheral blood mononuclear cells. **Physiological reports**, 3, n. 12, p. e12621, 2015.

IACOPETTA, B. Are there two sides to colorectal cancer? **International journal of cancer**, 101, n. 5, p. 403-408, 2002.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013-ciclos de vida: Brasil e grandes regiões. IBGE Rio de Janeiro 2015.

INCA. Estimativas para incidência e mortalidade por câncer 2002 Tipos de câncer atribuíveis ao tabagismo lideram previsões de mortalidade por câncer. Disponível em: <http://www.1.inca.gov.br/releases/2002/press_estimativas2002.html>, Acesso em: 03 fev de 2020

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro. 2019.

JACKSON, P. E.; O'CONNOR, P. J.; COOPER, D. P.; MARGISON, G. P. *et al.* Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. **Carcinogenesis**, 24, n. 3, p. 527-533, Mar 2003.

JACQUES, M.; HIAM, D.; CRAIG, J.; BARRÈS, R. *et al.* Epigenetic changes in healthy human skeletal muscle following exercise- a systematic review. **Epigenetics**, 14, n. 7, p. 633-648, Jul 2019.

JARVIS, M. C.; EBRAHIMI, D.; TEMIZ, N. A.; HARRIS, R. S. Mutation signatures including APOBEC in cancer cell lines. **JNCI cancer spectrum**, 2, n. 1, p. pky002, 2018.

JESSOP, P.; TOLEDO-RODRIGUEZ, M. Hippocampal TET1 and TET2 expression and DNA hydroxymethylation are affected by physical exercise in aged mice. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 6, p. 45, 2018.

JIANG, W.; ZHU, Z.; THOMPSON, H. J. Effects of limiting energy availability via diet and physical activity on mammalian target of rapamycin-related signaling in rat mammary carcinomas. **Carcinogenesis**, 34, n. 2, p. 378-387, Feb 2013.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, 8, p. 241-259, 2007.

KAINA, B.; CHRISTMANN, M.; NAUMANN, S.; ROOS, W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)**, 6, n. 8, p. 1079-1099, Aug 2007.

KANNEL, W. B.; SORLIE, P. Some health benefits of physical activity: the Framingham Study. **Archives of internal medicine**, 139, n. 8, p. 857-861, 1979.

KARLSSON, E.; EGENVALL, M.; FARAHNAK, P.; BERGENMAR, M. *et al.* Better preoperative physical performance reduces the odds of complication severity and discharge to care facility after abdominal cancer resection in people over the age of 70—A prospective cohort study. **European Journal of Surgical Oncology**, 44, n. 11, p. 1760-1767, 2018.

KASHIMOTO, R.; TOFFOLI, L.; MANFREDO, M.; VOLPINI, V. *et al.* Physical exercise affects the epigenetic programming of rat brain and modulates the adaptive response evoked by repeated restraint stress. **Behavioural brain research**, 296, p. 286-289, 2016.

KELLY, S. A.; ZHAO, L.; JUNG, K.-C.; HUA, K. *et al.* Prevention of tumorigenesis in mice by exercise is dependent on strain background and timing relative to carcinogen exposure. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

KIM, E.; DAVIDSON, L. A.; ZOH, R. S.; HENSEL, M. E. *et al.* Homeostatic responses of colonic LGR5+ stem cells following acute in vivo exposure to a genotoxic carcinogen. **Carcinogenesis**, 37, n. 2, p. 206-214, 2016.

KIM, E.; DAVIDSON, L. A.; ZOH, R. S.; HENSEL, M. E. *et al.* Rapidly cycling Lgr5+ stem cells are exquisitely sensitive to extrinsic dietary factors that modulate colon cancer risk. **Cell death & disease**, 7, n. 11, p. e2460-e2460, 2016.

KIM, K.; CASTRO, E. J. T.; SHIM, H.; ADVINCULA, J. V. G. *et al.* Differences regarding the molecular features and gut microbiota between right and left colon cancer. **Annals of coloproctology**, 34, n. 6, p. 280, 2018.

KOELWYN, G. J.; QUAIL, D. F.; ZHANG, X.; WHITE, R. M. *et al.* Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**, 17, n. 10, p. 620-632, 09 2017.

KUISMANEN, S. A.; HOLMBERG, M. T.; SALOVAARA, R.; DE LA CHAPELLE, A. *et al.* Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. **The American journal of pathology**, 156, n. 5, p. 1773-1779, 2000.

KYU, H. H.; BACHMAN, V. F.; ALEXANDER, L. T.; MUMFORD, J. E. *et al.* Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **bmj**, 354, p. i3857, 2016.

LEE, C. H. A.; KONG, J. C.; ISMAIL, H.; RIEDEL, B. *et al.* Systematic review and meta-analysis of objective assessment of physical fitness in patients undergoing colorectal cancer surgery. **Diseases of the Colon & Rectum**, 61, n. 3, p. 400-409, 2018.

LEVINE, D. S.; HAGGITT, R. C. Normal histology of the colon. **The American journal of surgical pathology**, 13, n. 11, p. 966-984, 1989.

LI, F.-Y. Colorectal cancer, one entity or three. **Journal of Zhejiang University Science B**, 10, n. 3, p. 219-229, 2009.

LIANG, P. S.; CHEN, T. Y.; GIOVANNUCCI, E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. **International journal of cancer**, 124, n. 10, p. 2406-2415, 2009.

LOVATEL, G. A.; ELSNER, V. R.; BERTOLDI, K.; VANZELLA, C. *et al.* Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiology of learning and memory**, 101, p. 94-102, 2013.

LUCERI, C.; DE FILIPPO, C.; CADERNI, G.; GAMBACCIANI, L. *et al.* Detection of somatic DNA alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. **Carcinogenesis**, 21, n. 9, p. 1753-1756, 2000.

LUNZ, W.; PELUZIO, M. C.; DIAS, C. M.; MOREIRA, A. P. *et al.* Long-term aerobic swimming training by rats reduces the number of aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Braz J Med Biol Res**, 41, n. 11, p. 1000-1004, Nov 2008.

MA, Y.; YANG, Y.; WANG, F.; ZHANG, P. *et al.* Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. **PloS one**, 8, n. 1, 2013.

MAH, L.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. **Leukemia**, 24, n. 4, p. 679-686, 2010.

MAHMOOD, S.; MACINNIS, R. J.; ENGLISH, D. R.; KARAHALIOS, A. *et al.* Domain-specific physical activity and sedentary behaviour in relation to colon and

rectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **International journal of epidemiology**, 46, n. 6, p. 1797-1813, 2017.

MARMOT, M.; ATINMO, T.; BYERS, T.; CHEN, J. *et al.* Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. 2007.

MCGINLEY, J. N.; THOMPSON, M. D.; THOMPSON, H. J. A method for serial tissue processing and parallel analysis of aberrant crypt morphology, mucin depletion, and beta-catenin staining in an experimental model of colon carcinogenesis. **Biological procedures online**, 12, n. 1, p. 118, 2010.

MCGUIRE, D. K.; LEVINE, B. D.; WILLIAMSON, J. W.; SNELL, P. G. *et al.* A 30-year follow-up of the Dallas Bed Rest and Training Study: I. Effect of age on the cardiovascular response to exercise. **Circulation**, 104, n. 12, p. 1350-1357, 2001.

MCINTYRE, R. E.; BUCZACKI, S. J.; ARENDS, M. J.; ADAMS, D. J. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. **Bioessays**, 37, n. 8, p. 909-920, Aug 2015.

MCTIERNAN, A.; FRIEDENREICH, C. M.; KATZMARZYK, P. T.; POWELL, K. E. *et al.* Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. **Medicine and science in sports and exercise**, 51, n. 6, p. 1252-1261, 2019.

MENIGATTI, M.; PEDRONI, M.; VERRONE, A. M.; BORGHI, F. *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation in colorectal carcinogenesis. **Oncology reports**, 17, n. 6, p. 1421-1427, 2007.

MEYERHARDT, J. A.; HESELTINE, D.; NIEDZWIECKI, D.; HOLLIS, D. *et al.* Impact of physical activity on cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer: findings from CALGB 89803. **J Clin Oncol**, 24, n. 22, p. 3535-3541, Aug 2006.

MEYERHARDT, J. A.; MANGU, P. B.; FLYNN, P. J.; KORDE, L. *et al.* Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. **J Clin Oncol**, 31, n. 35, p. 4465-4470, 2013.

MOORE, S. C.; LEE, I. M.; WEIDERPASS, E.; CAMPBELL, P. T. *et al.* Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. **JAMA Intern Med**, 176, n. 6, p. 816-825, 06 2016.

MORRIS, J. N.; HEADY, J.; RAFFLE, P.; ROBERTS, C. *et al.* Coronary heart-disease and physical activity of work. **The Lancet**, 262, n. 6796, p. 1111-1120, 1953.

NADEEM, M. S.; KUMAR, V.; AL-ABBASI, F. A.; KAMAL, M. A. *et al.*, 2020, **Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases**. Elsevier. 51-60.

NAKATANI, K.; KOMATSU, M.; KATO, T.; YAMANAKA, T. *et al.* Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. **Free radical research**, 39, n. 9, p. 905-911, 2005.

NEUFERT, C.; BECKER, C.; NEURATH, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. **Nat Protoc**, 2, n. 8, p. 1998-2004, 2007.

PARK, H.-C.; SHIN, A.; KIM, B.-W.; JUNG, K.-W. *et al.* Data on the characteristics and the survival of korean patients with colorectal cancer from the Korea central cancer registry. **Annals of coloproctology**, 29, n. 4, p. 144, 2013.

PATTERSON, K.; MOLLOY, L.; QU, W.; CLARK, S. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 56, p. e3170, 2011.

PAULSEN, J. E.; LØBERG, E. M.; ØLSTØRN, H. B.; KNUTSEN, H. *et al.* Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. **Cancer research**, 65, n. 1, p. 121-129, 2005.

PEDERSEN, B. K. The physiology of optimizing health with a focus on exercise as medicine. **Annual review of physiology**, 81, p. 607-627, 2019.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine—evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 25, p. 1-72, 2015.

PEDERSEN, L.; IDORN, M.; OLOFSSON, G. H.; LAUENBORG, B. *et al.* Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metab**, 23, n. 3, p. 554-562, Mar 2016.

PERŠE, M.; CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **BioMed Research International**, 2011, 2010.

PERŠE, M.; INJAC, R.; ŠTRUKELJ, B.; CERAR, A. High fat mixed lipid diet modifies protective effects of exercise on 1, 2 dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. **Technology in cancer research & treatment**, 11, n. 3, p. 289-299, 2012.

PINTO, D. G. C.; COSTA, M. A. C.; MARQUES, M. L. D. A. C. O índice de desenvolvimento humano municipal brasileiro. 2013.

QIN, X. Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. **World journal of gastroenterology: WJG**, 18, n. 15, p. 1708, 2012.

RADAK, Z.; GAAL, D.; TAYLOR, A. W.; KANEKO, T. *et al.* Attenuation of the development of murine solid leukemia tumor by physical exercise. **Antioxid Redox Signal**, 4, n. 1, p. 213-219, Feb 2002.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H. *et al.* The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic Biol Med**, 27, n. 1-2, p. 69-74, Jul 1999.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Prz Gastroenterol**, 14, n. 2, p. 89-103, 2019.

REDDY, B. S.; SUGIE, S.; LOWENFELS, A. Effect of voluntary exercise on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Cancer Res**, 48, n. 24 Pt 1, p. 7079-7081, Dec 1988.

ROBERTS, D. L.; DIVE, C.; RENEHAN, A. G. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. **Annual review of medicine**, 61, p. 301-316, 2010.

ROBSAHM, T. E.; AAGNES, B.; HJARTÅKER, A.; LANGSETH, H. *et al.* Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **European Journal of Cancer Prevention**, 22, n. 6, p. 492-505, 2013.

ROGERS, C. J.; COLBERT, L. H.; GREINER, J. W.; PERKINS, S. N. *et al.* Physical activity and cancer prevention : pathways and targets for intervention. **Sports Med**, 38, n. 4, p. 271-296, 2008.

ROOS, W.; BAUMGARTNER, M.; KAINA, B. Apoptosis triggered by DNA damage O 6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. **Oncogene**, 23, n. 2, p. 359-367, 2004.

RUIZ-CASADO, A.; MARTÍN-RUIZ, A.; PÉREZ, L. M.; PROVENCIO, M. *et al.* Exercise and the hallmarks of cancer. **Trends in cancer**, 3, n. 6, p. 423-441, 2017.

SAKAI, E.; MORIOKA, T.; YAMADA, E.; OHKUBO, H. *et al.* Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. **Cancer science**, 103, n. 1, p. 144-149, 2012.

SAKAI, E.; TAKAHASHI, H.; KATO, S.; UCHIYAMA, T. *et al.* Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 20, n. 9, p. 1918-1924, 2011.

SALTIN, B. Response to exercise after bed rest and after training. **Circulation**, 38, n. 7, p. 1-78, 1968.

SAMAD, A. K.; TAYLOR, R. S.; MARSHALL, T.; CHAPMAN, M. A. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. **Colorectal Dis**, 7, n. 3, p. 204-213, May 2005.

SATO, Y.; NANRI, H.; OHTA, M.; KASAI, H. *et al.* Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA by acute and chronic exercise in healthy male subjects. **Biochem Biophys Res Commun**, 305, n. 2, p. 333-338, May 2003.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, 31, n. 1, p. 27-36, 2010.

SHEPHARD, R. Physical activity and cancer. **International journal of sports medicine**, 11, n. 06, p. 413-420, 1990.

SHIMA, K.; MORIKAWA, T.; BABA, Y.; NOSHO, K. *et al.* MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. **Cancer Causes & Control**, 22, n. 2, p. 301-309, 2011.

SHOEMAKER, A. R.; HAIGIS, K. M.; BAKER, S. M.; DUDLEY, S. *et al.* Mlh1 deficiency enhances several phenotypes of Apc Min/+ mice. **Oncogene**, 19, n. 23, p. 2774-2779, 2000.

SOARES, J. P.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, M. M.; PEIXOTO, F. *et al.* Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. **Age**, 37, n. 3, p. 61, 2015.

SUTER, C. M.; MARTIN, D. I.; WARD, R. L. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. **International journal of colorectal disease**, 19, n. 2, p. 95-101, 2004.

SWANTON, C.; MCGRANAHAN, N.; STARRETT, G. J.; HARRIS, R. S. APOBEC enzymes: mutagenic fuel for cancer evolution and heterogeneity. **Cancer discovery**, 5, n. 7, p. 704-712, 2015.

TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. β -Catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. **Cancer research**, 58, n. 1, p. 42-46, 1998.

TAKAHASHI, M.; MUTOH, M.; KAWAMORI, T.; SUGIMURA, T. *et al.* Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 21, n. 7, p. 1319-1327, 2000.

TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M. *et al.* Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **New England Journal of Medicine**, 339, n. 18, p. 1277-1284, 1998.

TANG, A.; ENG, J. J.; KRASSIOUKOV, A. Application of the Sit-Up Test for orthostatic hypotension in individuals with stroke. **Autonomic Neuroscience**, 168, n. 1-2, p. 82-87, 2012.

TEJPAR, S.; STINTZING, S.; CIARDIELLO, F.; TABERNERO, J. *et al.* Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. **JAMA oncology**, 3, n. 2, p. 194-201, 2017.

TEODOZIO, C.; CHAVES, G.; ARCURI, I.; FRAJACOMO, F. Does grip strength decrease in the very early stages of hematological treatment? **Supportive Care in Cancer**, 26, n. 2, p. 333-335, 2018.

THOMPSON, B. A.; SPURDLE, A. B.; PLAZZER, J.-P.; GREENBLATT, M. S. *et al.* Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. **Nature genetics**, 46, n. 2, p. 107, 2014.

THORLING, E. B.; JACOBSEN, N. O.; OVERVAD, K. Effect of exercise on intestinal tumour development in the male Fischer rat after exposure to azoxymethane. **Eur J Cancer Prev**, 2, n. 1, p. 77-82, Jan 1993.

THUNE, I.; BRENN, T.; LUND, E.; GAARD, M. Physical activity and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, 336, n. 18, p. 1269-1275, 1997.

TOFFOLI, L.; VOLPINI, V.; NASCIMENTO, L.; SILVA, W. *et al.* Effects of chronic restraint stress on the global DNA methylation profile of rat lung cells: Modulation by physical exercise. **Behavioural brain research**, 331, p. 188-192, 2017.

TRYFIDOU, D. V.; MCCLEAN, C.; NIKOLAIDIS, M. G.; DAVISON, G. W. DNA Damage Following Acute Aerobic Exercise: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Medicine**, p. 1-25, 2019.

VAN VLIET, B. N.; CHAFE, L. L.; MONTANI, J. P. Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice. **The Journal of physiology**, 549, n. 1, p. 313-325, 2003.

VENA, J. E.; GRAHAM, S.; ZIELEZNY, M.; SWANSON, M. K. *et al.* Lifetime occupational exercise and colon cancer. **American Journal of Epidemiology**, 122, n. 3, p. 357-365, 1985.

VERSTEEG, K. S.; BLAUWHOFF-BUSKERMOLEN, S.; BUFFART, L. M.; DE VAN DER SCHUEREN, M. A. *et al.* Higher muscle strength is associated with prolonged survival in older patients with advanced cancer. **The oncologist**, 23, n. 5, p. 580, 2018.

VIGITEL, B. Saúde Suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Agência Nacional de Saúde Suplementar.–Brasília: Ministério da Saúde**, 2018.

VIGITEL, B. Vigitel Brasil 2019: VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS

CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. Agência Nacional de Saúde Suplementar.–Brasília: Ministério da Saúde 2020.

VIPPERLA, K.; O'KEEFE, S. J. Diet, microbiota, and dysbiosis: a 'recipe' for colorectal cancer. **Food & function**, 7, n. 4, p. 1731-1740, 2016.

WALCHLE, C.; DIWAN, B. A.; SHIAO, Y.-H.; CALVERT, R. J. Microsatellite instability is infrequent in azoxymethane-induced rat intestinal tumors: an assessment by capillary electrophoresis. **Toxicology and applied pharmacology**, 157, n. 1, p. 9-15, 1999.

WCRF. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. **World Cancer Research Fund/American Institute of Cancer Research**, 2018.

WCRF; AICR. Physical activity and the risk of cancer. Disponível em: <https://www.wcrf.org/sites/default/files/Physical-activity.pdf>.

WEST, M.; LYTHGOE, D.; BARBEN, C.; NOBLE, L. *et al.* Cardiopulmonary exercise variables are associated with postoperative morbidity after major colonic surgery: a prospective blinded observational study. **British Journal of Anaesthesia**, 112, n. 4, p. 665-671, 2014.

WHITE, A. J.; SANDLER, D. P.; BOLICK, S. C.; XU, Z. *et al.* Recreational and household physical activity at different time points and DNA global methylation. **European journal of cancer**, 49, n. 9, p. 2199-2206, 2013.

WINNINGHAM, M.; MACVICAR, M.; BONDOC, M.; ANDERSON, J. *et al.*, 1989, **Effect of aerobic exercise on body weight and composition in patients with breast cancer on adjuvant chemotherapy**. 683-689.

WIRTZ, S.; NAGEL, G.; ESHKIND, L.; NEURATH, M. F. *et al.* Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 31, n. 12, p. 2111-2117, Dec 2010.

WOLIN, K. Y.; YAN, Y.; COLDITZ, G. A.; LEE, I. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. **British journal of cancer**, 100, n. 4, p. 611-616, 2009.

WONG, R. Proximal tumors are associated with greater mortality in colon cancer. **Journal of general internal medicine**, 25, n. 11, p. 1157-1163, 2010.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K. *et al.* Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Research**, 60, n. 13, p. 3323-3327, 2000.

YOSHIMI, N.; MORIOKA, T.; KINJO, T.; INAMINE, M. *et al.* Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride. **Cancer science**, 95, n. 10, p. 792-797, 2004.

YU, M.; KING, B.; EWERT, E.; SU, X. *et al.* Exercise Activates p53 and Negatively Regulates IGF-1 Pathway in Epidermis within a Skin Cancer Model. **PLoS One**, 11, n. 8, p. e0160939, 2016.

YUASA, Y.; NAGASAKI, H.; AKIYAMA, Y.; HASHIMOTO, Y. *et al.* DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. **International Journal of Cancer**, 124, n. 11, p. 2677-2682, 2009.

ZENG, H.; IRWIN, M. L.; LU, L.; RISCH, H. *et al.* Physical activity and breast cancer survival: an epigenetic link through reduced methylation of a tumor suppressor gene L3MBTL1. **Breast Cancer Res Treat**, 133, n. 1, p. 127-135, May 2012.

ZHANG, F. F.; CARDARELLI, R.; CARROLL, J.; ZHANG, S. *et al.* Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. **Epigenetics**, 6, n. 3, p. 293-299, 2011.

ZHANG, J.; LI, J.; ZHU, Y.; MIAO, Z. *et al.* Forced running exercise mitigates radiation-induced cognitive deficits via regulated DNA hydroxymethylation. **Epigenomics**, n. 0, 2020.

ZIMMER, P.; BAUMANN, F. T.; BLOCH, W.; SCHENK, A. *et al.* Impact of exercise on pro inflammatory cytokine levels and epigenetic modulations of tumor-competitive lymphocytes in Non-Hodgkin-Lymphoma patients-randomized controlled trial. **Eur J Haematol**, 93, n. 6, p. 527-532, Dec 2014.

8. SUPLEMENTARES

8.1 NÍVEL DE METILAÇÃO DOS SÍTIOS CPG ANALISADOS EM *MLH1*

Analisamos a porcentagem de metilação de sete sítios CpG dentro da região promotora do gene *Mlh1*. No entanto, poucos animais apresentaram uma porcentagem de metilação mensurável nos sítios CpG analisados (Figura suplementar 8.1). O mesmo ocorreu entre os grupos expostos ao AOM.

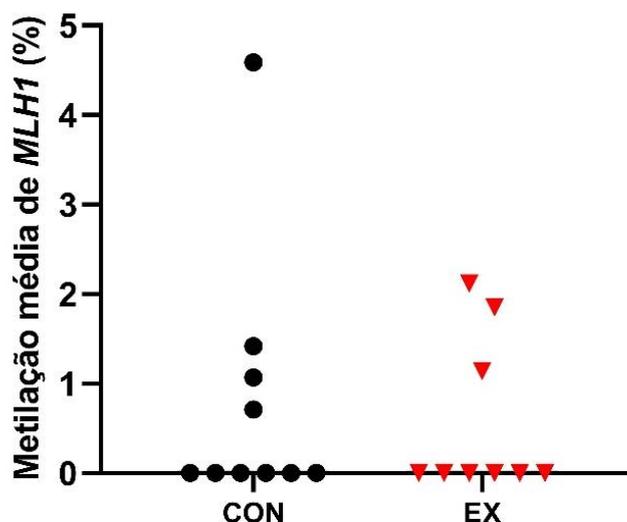


Figura suplementar 8.1: Perfil de metilação média de *Mlh1* nos grupos CON e EX; Teste de Mann Whitney

8.2 TESTE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE DNMT3A E APOBEC3 E OS NÍVEIS DE METILAÇÃO DE MGMT DO CÓLON DOS ANIMAIS EXERCITADOS

Investigamos se as alterações induzidas pelo exercício sobre a expressão gênica de *Dnmt3a* e *Apobec3* no cólon poderiam explicar os maiores níveis de metilação de *Mgmt* no grupo EX. No entanto, não houve correlação entre esses fenômenos (Figura Suplementar 8.2).

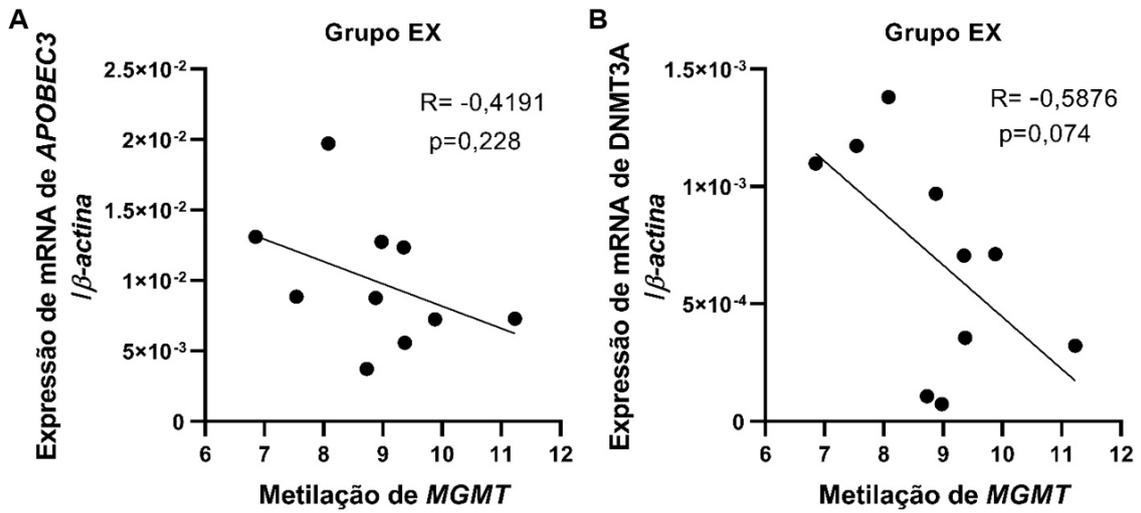


Figura suplementar 8.2: (A) Correlação entre a expressão gênica de *Apobec3* e os níveis de metilação de *Mgmt* no grupo EX (n=10); (B) Correlação entre a expressão gênica de *Dnmt3a* e os níveis de metilação de *Mgmt* no grupo EX (n=10); Teste de correlação por Coeficiente de correlação de Pearson.

9. ANEXOS

9.1 APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA)



PARECER DE AVALIAÇÃO DE PROJETO SUBMETIDO À CEUA – INCA

Protocolo CEUA - INCA nº 003/15

Parecer nº 001/16

Pesquisador: Sheila Coelho Soares Lima	
Título do projeto: Alterações genéticas e epigenéticas induzidas pelo exercício físico nas fases iniciais da carcinogênese de cólon	
Data de entrada: 08/12/2015	Data da reunião: 02/03/2016
Situação do Projeto: APROVADO	Validade: 01/02/2017
Considerações e Parecer:	
<p>Ao analisar a reapresentação do projeto de pesquisa "Alterações genéticas e epigenéticas induzidas pelo exercício físico nas fases iniciais da carcinogênese de cólon", tendo como pesquisador responsável Sheila Coelho Soares Lima, verificou-se que o mesmo encontra-se em conformidade com o Regimento Interno desta Comissão e os requisitos éticos na experimentação animal. Desta forma, classifico o protocolo como: APROVADO.</p> <p>Informo que o solicitante possui o prazo de 180 dias a contar da data de hoje para apresentar o relatório parcial de atividades relacionadas ao projeto aprovado e, após o término de validade do mesmo, o prazo de 30 dias para apresentar o relatório final, ambos em modelo aprovado pela CEUA-INCA. A não apresentação do relatório pode resultar na suspensão ou cancelamento da aprovação do projeto.</p>	

Rio de Janeiro, 03 de março de 2016.

Renata Batista da Silva Loza Telleria
Coordenadora da CEUA-INCA

Renata B. da Silva Loza Telleria
INCA-CGTC - Área de Recursos Humanos
Matrícula 1690847-MS
CRUZ-FJ 7041