

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

MARCELO BARBOSA NEVES

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E RESISTIDO NO
DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL EM CAMUNDONGOS

CAMPO GRANDE – MS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

MARCELO BARBOSA NEVES

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E RESISTIDO NO
DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Carcinogênese experimental e estudos do câncer na região Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Takita.

CAMPO GRANDE – MS

2021

DEDICATÓRIA

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, por ter me dado uma família maravilhosa.

Agradeço a meus pais e irmãos por todo amor e cuidado. Por terem enfrentado esse desafio comigo.

A meus pais, pela educação, conforto, amor, e por ter me dado irmãos maravilhosos.

A minha família por todo apoio e incentivo, é o bem mais precioso que tenho em minha vida.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho, meu orientador, por ter acreditado no projeto, pelo conhecimento transmitido durante esse projeto, pela paciência, me ensinar e orientar com maestria, além de ser meu orientador se tornou um amigo, no qual sempre serei eternamente grato por tudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Takita, coorientador, pela orientação e ensinamento.

A todos os membros do Laboratório de Carcinogênese Experimental, pela ajuda teórica e prática no desenvolvimento do projeto.

A todos os professores, amigos e colegas do Programa de Pós- Graduação e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obrigado por todo conhecimento adquirido no mestrado.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por ter concedido uma excelente estrutura e profissionais para o desenvolvimento do projeto.

A FINEP por ter financiado o Laboratório de Modelos Experimentais onde desenvolvi a parte experimental do meu trabalho.

A Capes pela bolsa de estudo concedida, para que eu pudesse me dedicar integralmente ao mestrado.

EPÍGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt).

RESUMO

Neves,M.B. Efeito do exercício físico aeróbico e resistido no desenvolvimento do câncer colorretal em camundongos, 2021. [Dissertação- Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Esse estudo teve como objetivo avaliar a ação do exercício físico aeróbico e exercício físico resistido no desenvolvimento do câncer colorretal induzido por e Azoximetano (AOM) associado à colite em camundongos.

Métodos: Os resultados foram obtidos através de um estudo experimental em modelo animal. O estudo foi desenvolvido na Faculdade De Medicina Da Universidade Federal Do Mato Grosso Do Sul, no município de Campo Grande – MS. Nesse estudo foram utilizados 40 animais divididos em 5 grupos de 8 animais, G1: natação pré e pós indução, G2: escada vertical pré e pós -indução, G3: natação pós indução, G4; escada vertical pós indução, G5; sedentários induzido ao câncer colorretal. Os animais foram induzidos ao câncer com dose total de 20 mg/Kg de Azoximetano, fracionadas em duas semanas, 10 mg/kg por semana , primeira dose na terceira semana e segunda dose na quarta semana. Para indução da colite foram realizados 3 ciclos de Dextran Sulfato De Sódio (DSS) por 5 dias intercalados com 2 semanas de água normal. Na décima quarta semana do experimento todos animais foram submetidos a procedimento de eutanásia, seus cólons foram removidos para análise macroscópica e microscópica, e lâminas de microscopia foram confeccionadas para permitir a classificação histológica de lesões encontradas visando a comparação entre os achados nos grupos experimentais.

Resultados: Os cinco grupos desenvolveram lesões neoplásicas, não houve diferenças significativas entre os grupos, entretanto, em relação aos sinais inflamatórios, houve diferença significativa, entre os grupos exercício em relação ao grupo sedentário, no desenvolvimento de ulceração mucosa ($p=0,016$). No desenvolvimento de pólipos houve diferença significativa na região distal ($p=0,003$), região medial ($p= 0,04$) e no número totais de pólipos ($p=0,002$).

Conclusão: O exercício físico não reduziu as lesões neoplásicas. Porém, reduziu o número de pólipos em regiões do cólon.

Palavra- Chaves :Câncer colorretal. Colite. Exercício físico. Azoximetano.

Abstract

Objective: This study aimed to evaluate the action of aerobic exercise and resistance in the development of colorectal cancer induced by and Azoximethane (OAM) associated with colitis in mice.

Methods: The results were obtained through an experimental study in animal model. The study was developed in the Medical Faculty Of The Federal University Of Mato Grosso do Sul, in the city of Campo Grande - MS. In this study 40 animals were used divided in 5 groups of 8 animals, G1: swimming pre and post induction, G2: vertical ladder pre and post induction, G3: swimming post induction, G4; vertical ladder post induction, G5; sedentary induced to colorectal cancer. The animals were induced to cancer with a total dose of 20 mg/Kg of azoximethane, fractionated in two weeks, 10 mg/kg per week, first dose in the third week and second dose in the fourth week. For colitis induction 3 cycles of sodium dextran sulfate (DSS) were performed for 5 days interspersed with 2 weeks of normal water. At the fourteenth week of the experiment all animals were submitted to euthanasia procedure, their colon was removed for macroscopic and microscopic analysis, and microscopy slides were made to allow the histological classification of lesions found aiming at comparing the findings in the experimental groups.

Results: The five groups developed neoplastic lesions, there was no significant difference between the groups, however, the inflammatory signs, there was a significant difference in the development of mucous ulceration ($p=0.016$). In the development of polyps there was a significant difference in the distal region ($p=0.003$), medial region ($p=0.04$), and total number of polyps ($p=0.002$).

Conclusion: Physical exercise did not reduce neoplastic lesions. However, it reduced the number of polyps in regions of the colon.

Key-word: Colorectal cancer. Colitis. Physical exercise. Azoximethane.

LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

%- por cento

Adap- adaptação

Akt- *Protein kinase B*

AMP- Adenosina Monofosfato

AMPC- 3'5'-Adenosina-Monofosfato-Cíclico

AOM- Azoximetano

APC- *Adenomatous Polyposis Coli Gene*

CCR- Câncer Colorretal

Células Nk- *Natural Killer*

CIMP- Metilação Da Ilha CpG

cm- centímetros

CTNNB1- Catenin Beta 1

CYP2E1- Citocromo P450 2e1

DCC- *Deleted In Colorrectal Carcinoma*

DMH- 1,2-Dimetilhidrazina

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DSS- Sulfato De Dextrano De Sódio

ER- *Estrogen Receptor*

FAP- Polipose Adenomatosa Familiar

g- Gramas

GSK-3- *Glycogen Synthase Kinase 3*

IL -6- *Interleucina 6*

IL-10- *Interleucina 10*

IL-17- *Interleucina 17*

IL-1RA- Receptor Antagonista Da Interleucina 1

IL-4- *Interleucina 4*

KRAS- *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene*

MAPK- *Mitogen-Activated Protein Kinas*

MCC- *Colorectal Mutant Cancer Protein*

mmol/L- milimoles por litro

mg- miligrama

MLH1- *Gene Human mut-L Homologue 1*
MMR- *Mismatch Repair*
MNNG- N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina
mRNA- Ácido Ribonucleico Mensageiro
MSH6- *Gene Human mut-S Homologue 6*
mTOR- *Mammalian target of rapamycin*
NAV2- *Neuron Navigator 2*
NIC- Instabilidade Cromossômica
°C - Grau Celsius
p38- *Proteína 38*
p53- *Proteína 53*
PAF– Polipose Adenomatosa Familiar
PDOX- *Patient-Derived Orthotopic Xenograft*
PDX- Xenoenxertos Derivados Do Paciente
PHIP- 2-Amino-1-Metil-6-Fenilimidozo [4,5-B] Piridina
RAS- Rat Sarcoma Vírus
Sem- Semana
SMAD2- *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2*
SMAD4- *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4*
SOX9- *Transcription Factor Sox-9*
TCF7L1- *Transcription Factor 7 Like 1*
TGFB- *Transforming Growth Factor B*
TLR2- Toll-Like Receptor 2
TNF- α - Tumor Necrosis Factor Alpha

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Intestino grosso.....	19
Figura 2 - Desenvolvimento de pólipos benignos ao câncer maligno	21
Figura 3- Mutações nos genes em relação ao câncer colorretal.	22
Figura 4- O desenvolvimento e a metástase do câncer colorretal e suas bases genéticas.....	23
Figura 5- Linha do tempo para a patogênese esporádica do CCR e suas vias moleculares caracterizadas.....	25
Figura 6- Função do gene APC	27
Figura 7- O sistema DNA MMR.	28
Figura 9- Adaptação mitocondrial induzida pelo treinamento físico no músculo esquelético.	31
Figura11- ilustra os possíveis mecanismos de proteção contra o CC pelo exercício.....	37
Figura 12- Desenvolvimento de camundongos nocauteados condicionais (com ablação temporal, celular e / ou específica de tecido da expressão gênica.....	41
Figura 13- Exercício em esteira motorizada.	47
Figura 14- Exercício físico corrida voluntária em roda.....	48
Figura 15- Exercício físico natação.	49
Figura16- Exercício físico escada vertical.	50
Figura17- Foto do segmento do cólon de 4 cm contendo múltiplos pólipos. ...	70
Figura 18- Fotomicrografia de um adenoma de cólon (setas).	73
.Figura 19- Fotomicrografia de foco de cripta aberrante.....	74
Figura 20- Fotomicrografia da mucosa colônica, hiperplasia linfóide e dilatação de vasos linfáticos.	75

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Cronograma geral da pratica de exercício físico.....	55
Quadro 1.1- Continuação do cronograma geral da pratica de exercício físico.	55
Quadro 2- Cronograma de natação.	56
Quadro 2.1- Continuação do cronograma de natação.	56
Quadro 3- Cronograma de escada vertical.	57
Quadro 3.1- Continuação do cronograma de escada vertical.	57
Quadro 4- Cronograma de indução ao câncer colorretal	59
Quadro 4.1- Continuação do cronograma de indução ao câncer colorretal ...	59
Tabela1- Evolução média de massa corporal dos grupos de animais (em gramas).....	65
Tabela 2- Média da massa corporal dos grupos de animais durante os ciclos de dextra sulfato de sódio.....	67
Tabela 3- Avaliação dos animais durante os ciclos de dss.	68
Tabela 4- Resultados de número de pólipos em relação entre grupos de exercício físico e sedentário.	70
Tabela 5- Resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios, em cada um dos grupos experimentais avaliados neste estudo.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Características do câncer colorretal	21
2.1.1 Instabilidade cromossômica	26
2.1.2 Instabilidade microssatélites	28
2.2 Exercício Físico	29
2.2.1 Exercício físico aeróbico	33
2.2.2 Exercício físico resistido	34
2.3 Exercício Físico e Câncer Colorretal	35
2.4 Indução ao câncer colorretal em modelo animal	37
2.4.1 Modelo Xenoenxerto	39
2.4.2 Modelo de Câncer Colorretal Espontâneo em Animais	40
2.4.3 Modelo quimicamente induzido	42
2.4.3.2 Modelo quimicamente induzido por 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine	43
2.4.3.3 Modelo quimicamente induzido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	44
2.4.3.4 Modelo quimicamente induzido por azoximetano	44
2.4.3.6 Modelo quimicamente induzido por azoximetano e sulfato de dextrano de sódio	45
2.5 Exercício físico em Modelo Animal	46
2.5.1 Corrida em esteira motorizada	47
2.5.2 Corrida voluntária em roda	47
2.5.3 Natação	48
2.5.4 Escada Vertical	49
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 METODOLOGIA	52
4.1 Tipo de pesquisa	52
4.2 Local de Pesquisa	52
4.3 Aspectos éticos	52
4.4 Animais	52
4.4.1 Delineamento experimental	53
4.5 Protocolos de exercício físico	53

4.5.1 Critérios de avaliação e interrupção do exercício	54
4.5.2 Adaptação natação	55
4.5.3 Protocolo de natação	55
4.5.4 Adaptação ao exercício resistido escada vertical	56
4.5.5 Protocolo de exercício resistido escada vertical	57
4.6 Indução da colite e câncer colorretal.....	59
4.6.1 Indução da colite	59
4.6.2 Indução ao câncer colorretal.....	59
4.7 Avaliação da indução de colite e câncer	59
4.8 Eutanásia	61
4.9 Coleta e armazenamento dos cólons.....	61
4.9.1 Formalização e preparo dos segmentos de cólon	62
4.10 Preparo das lâminas histológicas	62
4.11 Análise histopatológica das lâminas	62
4.12 Análise estatística	63
5 RESULTADOS	63
5.1 Evolução da massa corporal dos grupos experimentais durante o experimento CCR associado a colite.	64
5.2 Avaliação dos animais durante os ciclos Dextran Sulfato de Sódio	66
5.3 Desenvolvimentos de pólipos	69
5.4 Análise histológica	70
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO	80
8 REFERÊNCIAS	81
9 ANEXO	94
Anexo 1- Certificado Da Comissão De Ética No Uso De Animais CEUA da UFMS.....	94
Anexo2- Artigo submetido: Effect Of Physical Exercise On Colorectal Cancer: Systematic Review. International Journal for Innovation Education and Research (IJIER).	95

1 INTRODUÇÃO

Os fatores genéticos e ambientais desempenham um papel importante na etiologia do câncer colorretal. A maioria dos cânceres colorretais é esporádica, aproximadamente três quartos dos pacientes têm um histórico familiar negativo (KUIPERS *et al.*, 2015).

A designação câncer colorretal (CCR), refere-se ao câncer que acomete o cólon, a junção retossigmóide, o reto, e está entre os tumores malignos mais comuns no mundo. É o terceiro tipo mais frequente entre homens no mundo, e o segundo para o sexo feminino (HUWE *et al.*, 2014). A incidência estimada do CCR é de 1,36 milhão de por ano no mundo (PILLERON *et al.*, 2020). O Instituto Nacional Do Câncer (INCA) estimou 40.990 novos casos no Brasil em 2020, sendo 20.520 homens e 20.470 mulheres (INCA, 2019).

Demonstrou-se que o ganho de peso entre o início da idade adulta e a meia-idade está associado a um risco significativamente aumentado de CCR. Por outro lado, o exercício físico regular está associado a uma redução de 24 a 31% no CCR (PATEL; AHNEN, 2018).

Exercício físico contribui para proteger contra o câncer, além de contribuir para a manutenção do peso corporal saudável. Manter um peso saudável ao longo da vida é uma das formas mais importantes de se proteger contra o câncer. A inatividade física é o quarto principal fator de risco de morte no mundo. Aproximadamente 3,2 milhões de pessoas morrem a cada ano em decorrência da falta de exercício físico (MÁRMOL *et al.*, 2014).

Claramente, o exercício físico pós-diagnóstico está associada a uma melhora nos resultados da doença em pacientes com CCR. Estudo de meta-análise de SHAW *et al.*, (2014) avaliando estudos de coorte prospectivos mostrou uma redução de 25% na mortalidade específica de CCR naqueles que participaram de qualquer exercício físico em qualquer nível antes do diagnóstico em comparação com aqueles sedentários. confirmando associação do exercício físico com melhores desfechos da doença.

Um dos mecanismos pelos quais o exercício físico pode alterar o desenvolvimento do câncer colorretal é através de seus efeitos na melhora da

função do sistema imunológico e na diminuição da inflamação crônica, modula positivamente alguns fatores relacionados com o desenvolvimento do câncer colorretal, tais como, a disfunção do sistema imune, a dieta, a obesidade, a ação da insulina, os níveis de prostaglandinas e os triglicérides, mecanismos de defesa antioxidantes (DA SILVA *et al.*, 2020).

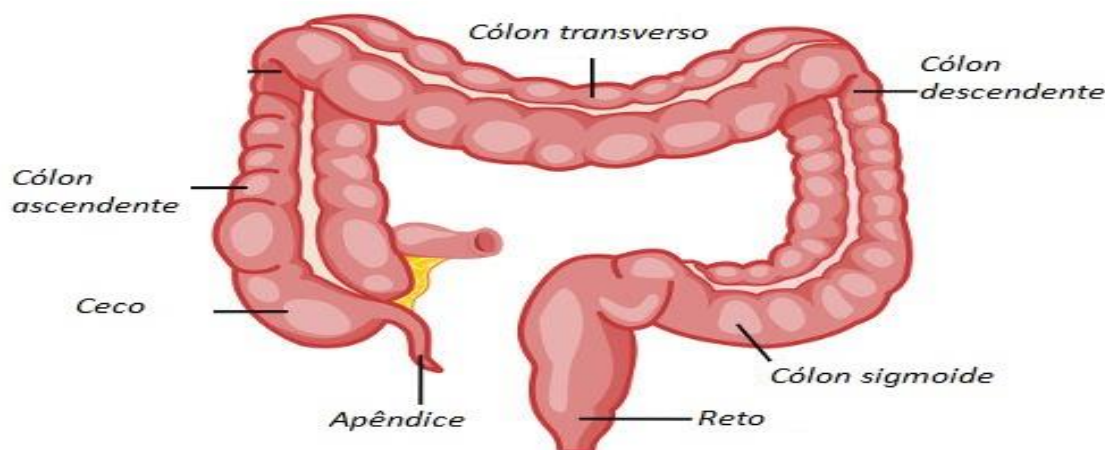
O modelo de estudo animal tem sido principal fonte de estudo do câncer, por sua capacidade de simular grande parte das características de tumores humanos sendo ferramentas críticas necessárias para estudar os mecanismos moleculares da carcinogênese colorretal, essenciais para desenvolver novas estratégias para tratamento (ABREU *et al.*, 2020; AUGUSTO *et al.*, 2019).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Uma variedade de fatores ambientais em grande parte modificáveis do estilo de vida influencia o risco de desenvolver CCR. Os principais fatores relacionados ao maior risco de desenvolver câncer do intestino são idade igual ou acima de 50 anos, excesso de peso corporal e alimentação não saudável, inatividade física, histórico familiar de câncer de intestino, história pessoal de câncer de intestino, ovário, útero ou mama, além de tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas (MOURA *et al.*, 2020).

Do ponto de vista clínico, os cânceres de cólon geralmente são subdivididos como mostrado na figura 1, em proximal ou do lado direito do intestino grosso, quando se originam de seções do cólon proximais à flexão esplênica (ceco, cólon ascendente e cólon transverso), enquanto tumores distais ou do lado esquerdo. Os cânceres de cólon são classificados como câncer retal quando surgem até 15 cm do esfíncter anal (PATEL; AHNEN, 2018).

Figura 1- Intestino grosso.



Fonte: Santos, 2020.

O câncer retal mostra taxas mais altas de recidiva loco-regional e metástases pulmonares, enquanto o câncer de cólon tem um tropismo maior para a propagação para fígado e geralmente tem um prognóstico moderadamente melhor (TESTA; PELOSI; CASTELLI, 2018).

Doenças inflamatórias do intestino, como retocolite ulcerativa crônica e doença de Crohn, também aumentam o risco de câncer do intestino, bem como doenças hereditárias, como polipose adenomatosa familiar (FAP) e *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) (INCA, 2020).

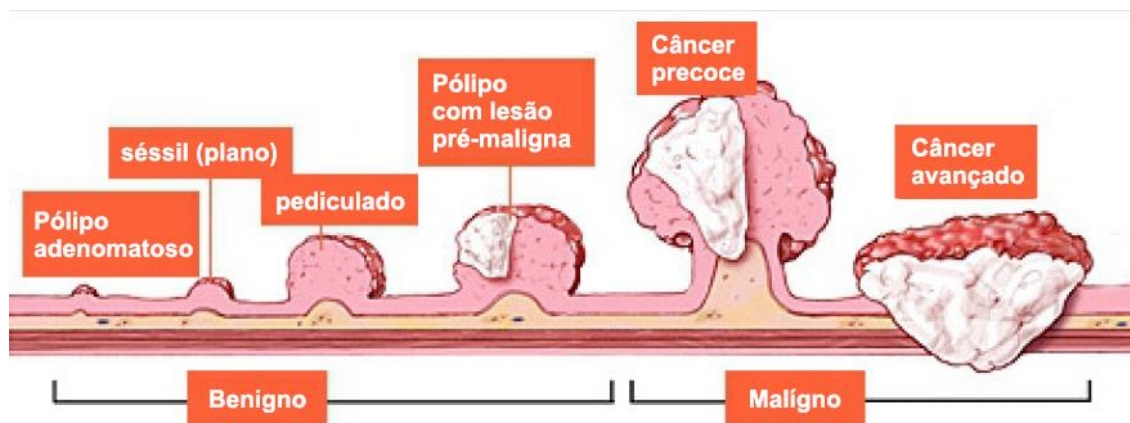
Historicamente, as síndromes hereditárias do câncer têm sido implicadas em 3% a 5% do total de CCRs, em indivíduos que abrigam mutações da linha germinativa em genes específicos com alto risco de desenvolver CCR em idades jovens. A síndrome de Lynch, a síndrome do câncer hereditário mais comum associada à predisposição para a CCR, está associada a mutações na linha germinativa nos genes de *Mismatch Repair DNA* (MMR). (STOFFEL *et al.*, 2018).

A variabilidade dos comportamentos clínico e biológico do CCR tem suscitado grande interesse pelo estudo de fatores que possam estar associados à progressão da neoplasia e, conseqüentemente, ao prognóstico da doença (PRIOLLI *et al.*, 2007).

A alteração do gene *Adenomatous Polyposis Coli Gene* (APC), se não herdada, ocorre como a primeira alteração molecular no desenvolvimento do câncer colorretal, enquanto as alterações estruturais dos genes *myc*, *Rat Sarcoma Vírus*, (RAS), Proteína 53 (p53), Colorectal mutant cancer protein (MCC) e *Deleted in Colorretal Carcinoma* (DCC) são consideradas eventos tardios. Todas essas investigações levaram a um melhor entendimento da etiologia do câncer e diagnóstico precoce do câncer colorretal nas formas hereditária e esporádica da doença (DASH, 2020; PANDURO CERDA; LIMA GONZÁLEZ; VILLA LOBOS, 1993).

Os pólipos adenomatosos têm sido responsabilizados pela origem da maioria dos carcinomas colorretais foi observada a coexistência de adenomas em pacientes com carcinomas cólicos; distribuição semelhante dos pólipos adenomatosos e câncer nas mesmas áreas do intestino grosso; componentes epiteliais neoplásicos nos pólipos adenomatosos; e a presença de componentes polipoides adenomatosos dentro de carcinomas bem diferenciados. Além disso, os adenomas têm sido frequentes em populações com alta incidência de câncer colorretal (LASSANCE *et al.*, 2012).

Figura 2 - Desenvolvimento de pólipos benignos ao câncer maligno



Fonte: INCA, 2014.

Numerosos estudos genéticos moleculares da CCR revelaram muitos genes que são caracterizados por alta frequência de mutações *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (*KRAS*), *harvey Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (*NRAS*), *BRAF*, *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha* (*PIK3CA*), *APC*, *TP53*, *Mothers against decapentaplegic homolog 2-4* (*SMAD2-SMAD4*), *AT-rich interactive domain-containing protein 1A* (*d1A*), *Transcription factor SOX-9* (*SOX9*), *FAM123B / WTX* e *FBXW7*), alterações no número de cópias *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (*ERBB2*) e *Insulin-like growth factor 2* (*IGF2*), alterações no status de metilação (*MLH1*), expressão prejudicada no nível do Ácido Ribonucleico Mensageiro (mRNA) ou da proteína e translocações *Neuron Navigator 2* (*NAV2*) / *transcription factor 7 like 1* (*TCF7L1*) (KUDRYAVTSEVA et al., 2016).

O desenvolvimento da maioria dos tumores colorretais é causado pela desregulação de várias vias de transdução de sinal - *Wnt*, *Transforming Growth Factor B* (*TGFβ*) / *Bone morphogenetic proteins* (*BMP*), *Receptor tyrosine kinases* (*RTK*) / *Ras*, *PI3K/Akt*. A ativação da via canônica de *Wnt* contribui para o início e progressão de mais de 90% de adenocarcinomas colorretais e adenomas (KUDRYAVTSEVA et al., 2016; HARALDSDOTTIR, 2014).

2.1 Características do câncer colorretal

O CCR não é uma doença homogênea, mas podendo ser classificada em diferentes subtipos, caracterizados por alterações moleculares e morfológicas específicas. A transformação do epitélio colônico normal em lesão pré-cancerosa

(adenoma) e carcinoma invasivo requer um acúmulo de mutações genéticas somáticas (adquiridas) e/ou germinativas herdadas (BIEN *et al.*, 2019).

A tumorigênese é um processo de várias etapas e que essas etapas refletem alterações genéticas que levam à transformação progressiva de células humanas normais em derivados altamente malignos (HANAHA; WEINBERG, 2000; DAS; KALITA; PAL, 2017).

Mutações em duas grandes classes de genes estão envolvidas no estabelecimento do câncer: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (PRITCHARD, 2016).

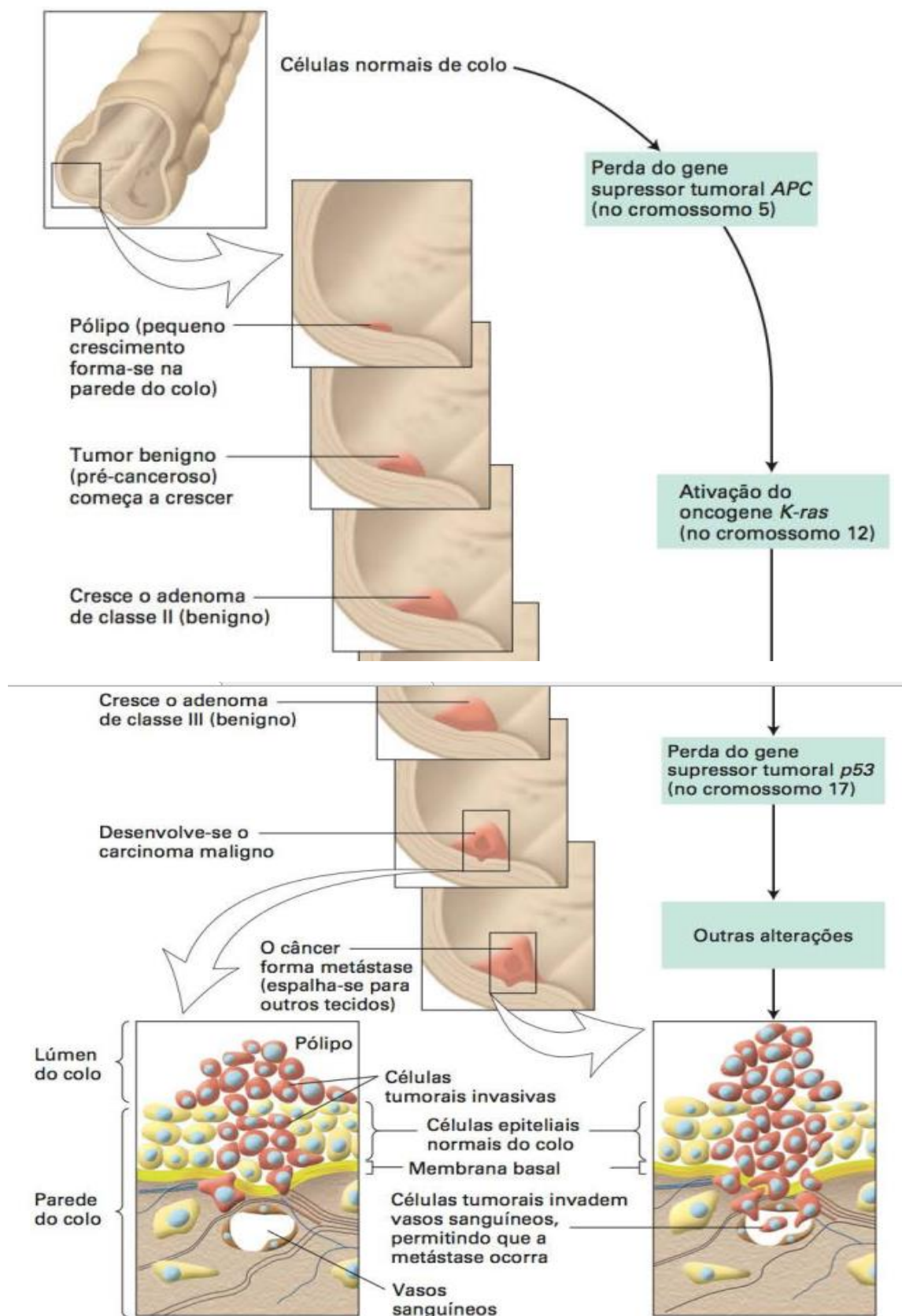
- Mutações nos genes em relação ao câncer colorretal.

Cancer hallmarks	Examples of involving factors in CRC
Growth signal autonomy	EGFR, KRAS, BRAF
Insensitivity to antiproliferative signals	P53, PTEN, APC
Unlimited replicative potential	TERT
Angiogenesis	VEGF
Escaping apoptosis	P53, MLH1
Invasion and metastasis	Cdc-42, RhoA GTPase
Reprogramming of cell metabolism	PI3K, AKT, c-MYC
Evading immune destruction	IL-8

Fonte: HAGLAND *et al.*, 2013.

Durante o desenvolvimento do adenocarcinoma colorretal, as células epiteliais gastrointestinais adquirem mutações genéticas e epigenéticas sequenciais em oncogenes específicos e/ou genes supressores de tumor, conferindo a eles uma vantagem seletiva na proliferação e na auto-renovação. Assim, o epitélio normal torna-se mucosa hiperproliferativa e subsequentemente origina um adenoma benigno que evolui para carcinoma e metástase em cerca de 10 anos (DE ROSA *et al.*, 2015).

Figura 4- O desenvolvimento e a metástase do câncer colorretal e suas bases genéticas.



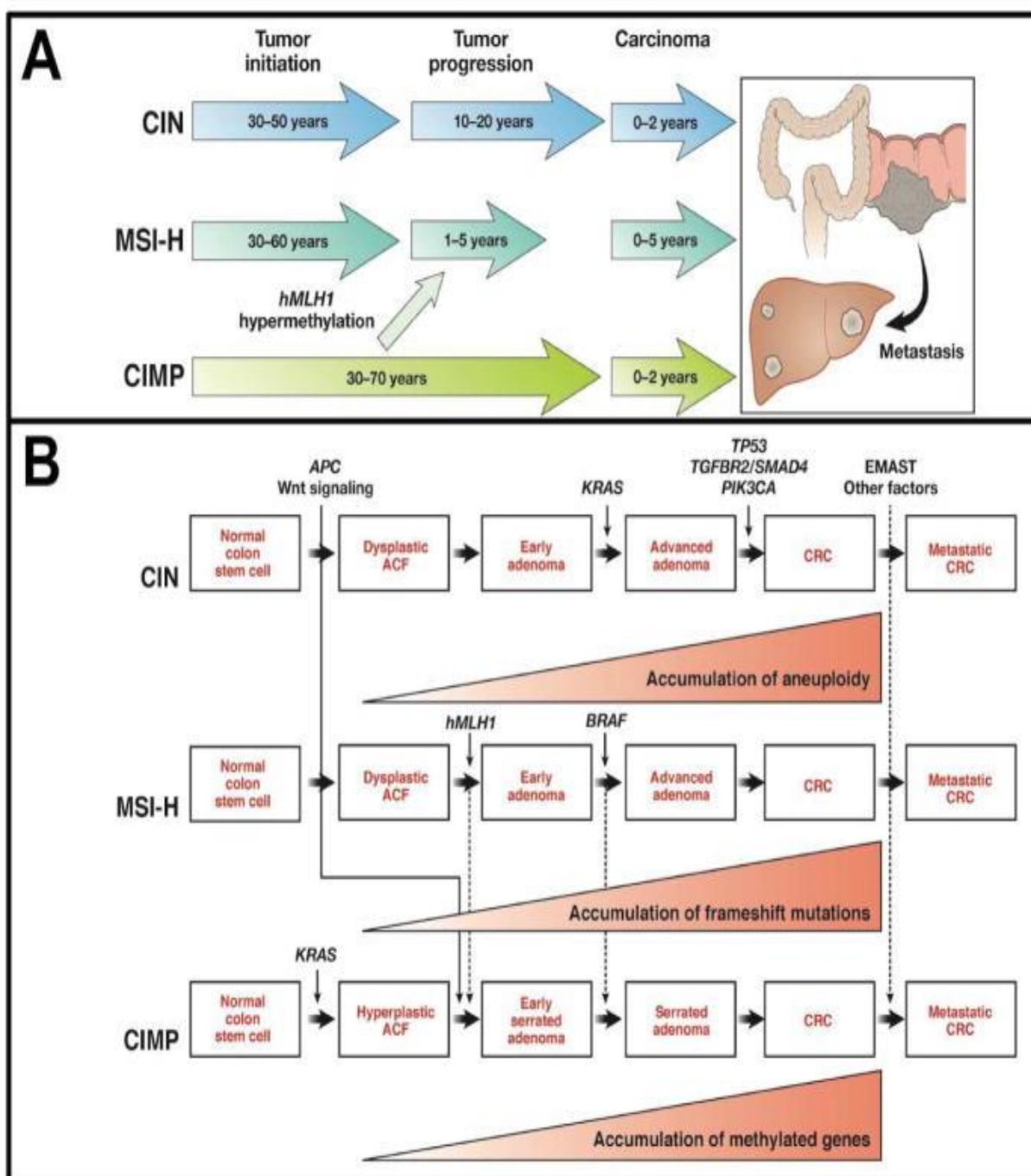
Fonte: Lodish, 2014.

A teoria da carcinogênese colônica apresenta uma evolução de mutação clonal que oferece uma vantagem de sobrevivência da imortalidade celular e permite desenvolver mais mutações, fornecendo outras características do câncer, como proliferação, invasão, metástase e outras (RECIO-BOILES; WAHEED; CAGIR, 2019). Uma característica importante do CCR é a instabilidade genética que pode surgir por pelo menos dois mecanismos diferentes, instabilidade cromossômica (NIC) e instabilidade microssatélites (MSI).

Na NIC acontece numerosas mutações inativadoras raras de genes cuja função normal é manter a estabilidade cromossômica durante a replicação, essas mutações são responsáveis pela maior parte da instabilidade cromossômica nos tumores CCR (MÁRMOL *et al.*, 2017).

Os microssatélites são sequências de DNA repetidas, distribuídas por todo o genoma humano, tanto nas regiões codificantes quanto nas não codificantes. Devido à sua estrutura repetida, os microssatélites são particularmente propensos a erros de replicação que normalmente são reparados pelo sistema *Mismatch Repair* (MMR) (GIAN *et al.*, 2018).

Figura 5- Linha do tempo para a patogênese esporádica do CCR e suas vias moleculares caracterizadas.



FONTE: CARETHERS; JUNG, 2015.

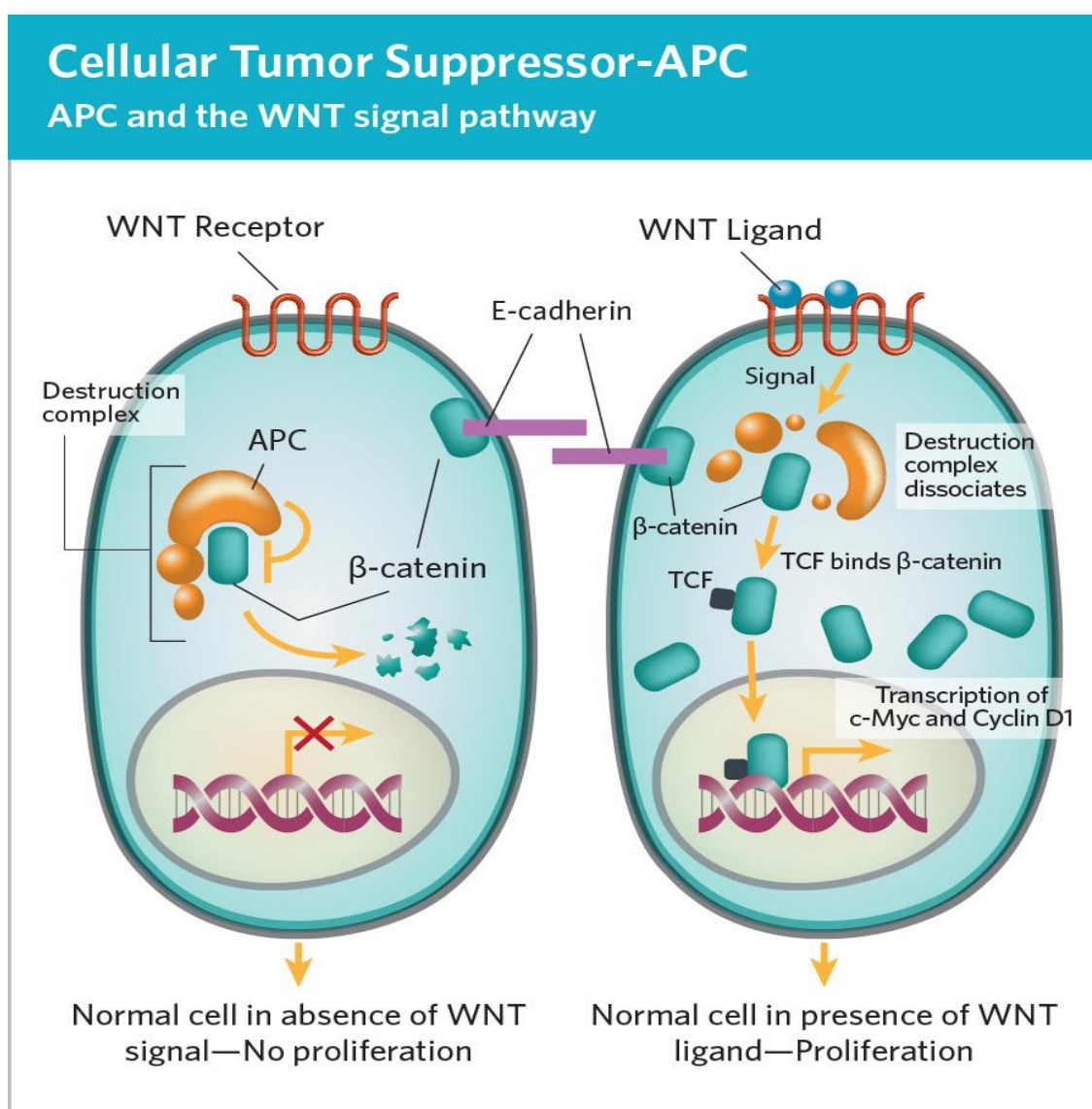
2.1.1 Instabilidade cromossômica

Cerca de 84% da CCR esporádico é caracterizado por instabilidade cromossômica (NIC). O câncer colorretal esporádico é definido como cânceres que surgem do colo retal sem contribuição conhecida de causas da linha germinativa ou histórico familiar significativo de câncer ou doença inflamatória intestinal (CARETHERS; JUNG, 2015), dois terços de todos os CCR se enquadram nessa definição, e o CCR esporádico é o tipo mais comum na prática clínica. Com grandes alterações no número e na estrutura dos cromossomos, incluindo deleções, ganhos, translocações e outros rearranjos cromossômicos que se caracterizam por um aumento espontâneo ou induzido da frequência de quebras e/ou rearranjos cromossômicos, resultando numa maior susceptibilidade à ocorrência de neoplasias (MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016; CORREIA, 2017). Como a DNA polimerase não pode replicar completamente a extremidade 5' das fitas recém-sintetizadas, os telômeros diminuem a cada replicação celular. Após um número crítico de divisões, os telômeros atingem o limite de Hayflick e não podem mais ser protegidos pelo complexo Shelterin, sendo assim reconhecidos (JAFRI *et al.*, 2016).

Os tumores NIC geralmente surgem como uma combinação de ativação do oncogene e inativação do gene supressor de tumor (por exemplo, APC, SMAD4 e TP53) por perda e mutação alélica, que acompanham as alterações nas características do tumor no adenoma para sequência de carcinoma, como primeiro descrito por (Fearon e Vogelstein 1990 *apud* MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016).

Um evento inicial importante nesta via é a hiperativação da via de sinalização WNT, geralmente decorrente de mutações no gene APC. Anormalidades da via WNT caracterizam a maioria dos cânceres colorretais esporádicos, bem como os tumores que surgem em pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) mais de 80% dos adenomas e CCR exibem mutações APC e outros 5 a 10% estão mostrando mutações ou alterações epigenéticas em outros componentes de sinalização do WNT (por exemplo, β -catenina) que resultam igualmente na hiperativação da via WNT. (BOLHAQUEIRO *et al.*, 2019).

Figura 6– Função do gene APC



Fonte: AOKI *et al.*, 2007.

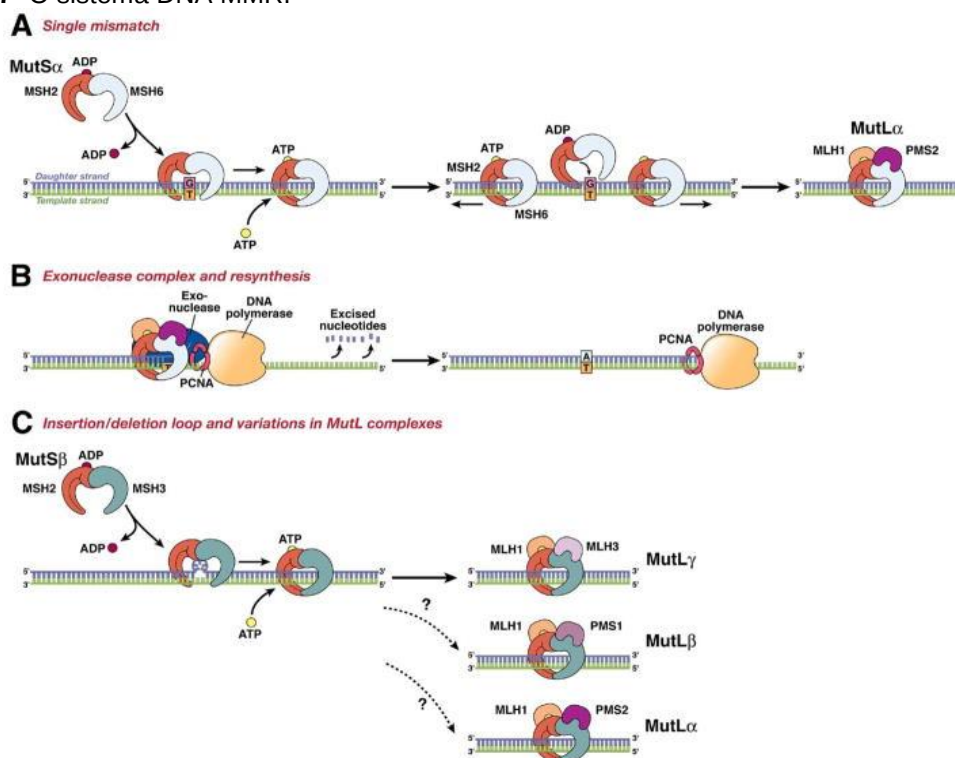
As mutações de PIK3CA, SMAD4 e p53 estão relacionadas ao estágio tardio, a transição do adenoma para o carcinoma. No entanto, se eventos genéticos precoces ou tardios contribuem para a metástase da CCR (KAWAGUCHI *et al.*, 2019). Além disso, o KRAS e o BRAF codificam uma proteína que pertence à via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK, a ativação dessa via é considerada um interruptor molecular que leva ao crescimento e proliferação celular. Ocorrendo tardiamente na patogênese da CCR, propõe-se que a perda da função da p53 seja um dos principais eventos no desenvolvimento da CCR (HUANG *et al.*, 2018).

A proteína p53 é um regulador transcricional central responsável por proteger a integridade genômica, interromper o ciclo celular e facilitar o reparo do DNA. Na presença de dano catastrófico ao DNA, a p53 inicia a apoptose (DROST *et al.*, 2015).

2.1.2 Instabilidade microssatélites

Em torno de 13 a 16% da CCR esporádica, é hipermutado e mostra instabilidade microssatélites (MSI) devido ao reparo defeituoso do DNA MMR, frequentemente associado ao TP53 do tipo selvagem e a um padrão quase diplóide de instabilidade cromossômica. Além disso, o fenótipo de metilação da ilha CpG (CIMP) é uma característica que induz instabilidade epigenética por hipermetilação promotora e silenciamento de uma variedade de genes supressores de tumores, incluindo MLH1, um dos genes MMR (MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016; KHOT *et al.*, 2020).

Figura 7- O sistema DNA MMR.



Fonte: BOLAND; GOEL, 2010.

O DNA é molécula que sofre frequentemente alterações através de perdas de segmentos, mutações ocorridas durante o processo de divisão celular. Para corrigir tais alterações dispõe-se de algumas proteínas com função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA (GELSOMINO *et al.*, 2016). Essas

proteínas são produzidas a partir de alguns genes MMR e sua função é exercida de forma contínua, preservando os tecidos celulares. A MSI é fruto da inativação das proteínas de reparo do DNA e se constitui na base molecular do câncer colorretal HNPCC (GIAN *et al.*, 2018). Genes relacionados com o reparo do DNA estão envolvidos no MMR, tais como: *Gene Human mut-L Homologue 1* (hMLH1), *Gene Human mut-S Homologue 2* (hMSH2), *Gene Human mut-S Homologue 6* (hMSH6). O gene hMLH1 está localizado no cromossoma 3p21-23 e o hMSH2 no cromossoma 2p21, em área inicialmente identificada como região importante para genes envolvidos no HNPCC (LOSSO *et al.*, 2012; DIETMAIER *et al.*, 2019).

O estresse oxidativo provoca quebras simples e duplas nas fitas que compõem as moléculas do DNA e induz a erros de pareamento das bases nitrogenadas possibilitando, conseqüentemente, aparecimento de mutações genéticas. Quando a mutação ocorre em genes responsáveis pelo controle do binômio proliferação/morte celular poderá haver formação de um clone de células com autonomia proliferativa ou resistência a apoptose, características inerentes a célula neoplásica (MARTINEZ *et al.*, 2009).

2.2 Exercício Físico

Exercício físico ao longo da vida é um meio potente de reduzir o risco de doenças não transmissíveis, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e outros distúrbios inflamatórios crônicos (CAMPBELL; TURNER, 2018).

Com a recente aplicação de técnicas moleculares ao exercício da biologia, houve uma maior compreensão da multiplicidade e complexidade das redes celulares envolvidas nas respostas ao exercício (WIDMANN; NIEB; MUNZ, 2019).

Dependendo da intensidade e duração do exercício, diferentes mecanismos são necessários para disponibilizar energia e, sob controle homeostático, isso é garantido por mudanças rápidas e coordenado na secreção de vários hormônios (MOGHETTI *et al.*, 2016).

O exercício físico induz várias adaptações metabólicas para atender às crescentes necessidades de energia. A metilação do DNA do promotor, modificações pós-traducionais da histona ou expressão do microRNA estão

envolvidas nas alterações da expressão gênica implicadas na adaptação metabólica após o exercício (VOISIN, *et al.*, 2015).

As modificações epigenéticas e muitas enzimas epigenéticas são potencialmente dependentes de alterações nos níveis de metabólitos, como oxigênio, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, 2-oxoglutarato, 2-hidroxioglutarato e β -hidroxibutirato e, portanto, são suscetíveis às alterações induzidas pelo exercício em de maneira dependente de tecido. A maioria dessas alterações é regulada por importantes modificadores epigenéticos que controlam a metilação do DNA e modificações pós-traducionais em caudas de histonas controladas por acetona-transferase de histonas, desacetilases de histonas e desmetilases de histonas, entre outras. (PAREJA-GALEANO; SANCHIS- GOMAR; GARCÍA-GIMÉNEZ, 2014).

Os impactos do exercício físico na inflamação também influenciam os padrões de expressão dos miRNAs nos leucócitos, como granulócitos e células mononucleares do sangue periférico (PMNCs). Sabe-se que os neutrófilos têm um papel fundamental durante a inflamação aguda, crônica e nas respostas imunes adaptativas (BERNARDO *et al.*, 2016).

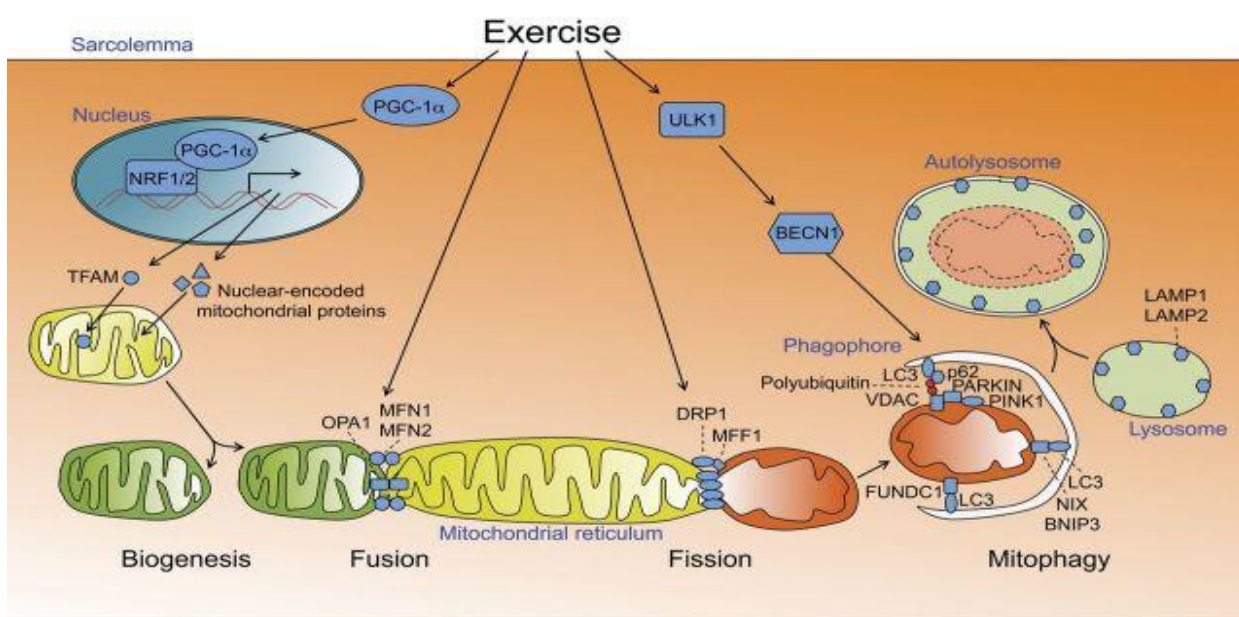
Em nível celular características que representam denominadores comuns ao decorrer da vida: são instabilidade genômica, atrito de telômeros, perda de homeostase proteica, detecção de nutrientes desregulada, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco, comunicação intercelular alterada e alterações epigenéticas. A maioria dessas características é influenciada e alterada pelo exercício físico (SAFDAR, *et al.*, 2011; FERIOLI *et al.*, 2019).

As citocinas pró inflamatórias contribuem para o desenvolvimento de inúmeras doenças. O exercício físico agudo leva a um padrão curto de citocinas inflamatórias especialmente um aumento da *interleucina 6* (IL -6), que é seguido por uma resposta anti-inflamatória a médio prazo aumento da *interleucina 10* (IL-10) , depressão da produção de Tumor Necrosis Factor Alph (TNF- α) e diminuição de expressão de receptores solúveis de citocinas pró-inflamatórias. O exercício físico regular tem efeito anti-inflamatório crônico, o que pode contribuir com efeitos preventivos para todas de doenças. Além do padrão de citocinas, numerosos estudos relataram diminuição dos níveis séricos da proteína C reativa inflamatória em fase aguda após diferentes intervenções no exercício. (ZIMMER; BLOCH, 2015; JOISTEN *et al.*, 2019).

O exercício físico pode ter efeitos cumulativos que resultam em maior capacidade de induzir autofagia e mitofagia em resposta ao exercício e maior em repouso. Teoricamente, esse estado de aumento de autofagia/mitofagia basal e capacidade no músculo esquelético resulta em melhoria e manutenção da qualidade mitocondrial e pode ser parte integrante de como o treinamento físico promove a saúde e aumenta o desempenho físico (MENDES; MARTINS, 2020).

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas, capazes de atender às demandas de energia em constante mudança do exercício por meio de múltiplos processos interconectados. As melhorias na quantidade e qualidade mitocondrial são fundamentais para melhorar as funções contráteis e metabólicas do músculo esquelético (MOREIRA *et al.*, 2017).

Figura 9- Adaptação mitocondrial induzida pelo treinamento físico no músculo esquelético.

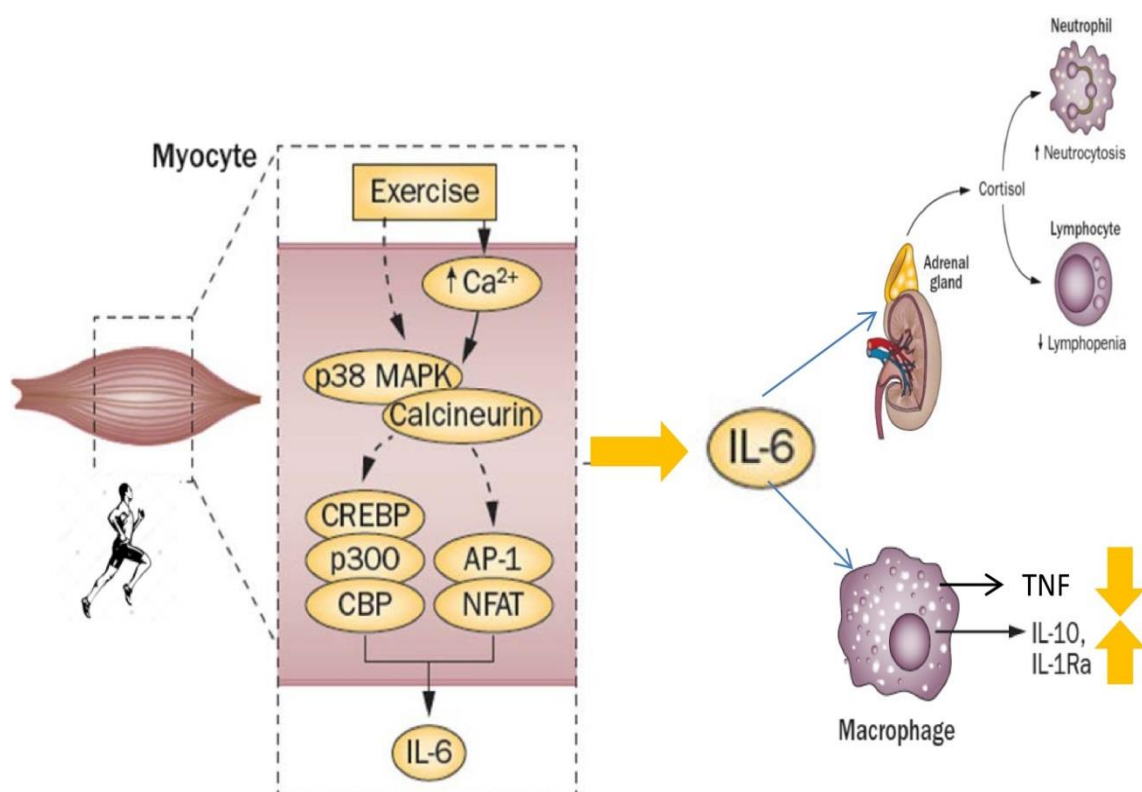


Fonte: DRAKE; WILSON; YAN, 2016.

Esse processo adaptativo requer um equilíbrio entre os processos opostos da biogênese mitocondrial e da mitofagia, juntamente com a dinâmica mitocondrial extremamente versátil, que acaba contribuindo para o aprimoramento do desempenho físico e dos benefícios para a saúde do treinamento físico (DRAKE; WILSON; YAN, 2016).

Efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo exercício podem suprimir o recrutamento e a ativação de neutrófilos e monócitos/macrófagos como fontes de mediadores inflamatórios e ERO e na prevenção de danos nos tecidos induzidos pelo exercício (SUZUKI *et al.*, 2019; FRODERMANN *et al.*, 2019). O músculo esquelético é capaz de se comunicar com outros órgãos por meio de peptídeos secretores, as chamadas miocinas (PARASCHIVA; SILVA; LIMA, 2009).

Figura: 10- fatores de transcrição durante o exercício físico.



Fonte: PEDERSEN, 2017.

As evidências sugerem que a contração do músculo esquelético leva ao aumento do Ca^{2+} citosólico e à ativação da *Proteína 38* (p38) MAPK e/ou calcineurina, o que leva à ativação dos fatores de transcrição, dependendo desses eventos a montante. A IL - 6 tem efeitos anti-inflamatórios, pois inibe a produção de $\text{TNF-}\alpha$, maior estímulo da ocorrência das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra e IL-10. (PEDERSEN, 2017; PAOLUCCI *et al.*, 2018).

Períodos prolongados de treinamento intensivo podem deprimir a imunidade, enquanto exercícios regulares de intensidade moderada são benéficos. Exercícios únicos evocam uma impressionante leucocitose e uma redistribuição de células efetoras entre o compartimento sanguíneo e os tecidos linfóide e periféricos, uma

resposta que é mediada pelo aumento da hemodinâmica e pela liberação de catecolaminas e glicocorticóide após a ativação do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. (ARAUJO, 2015).

Sessões únicas de exercício prolongado podem prejudicar a função das células T, células *Natural Killer* (NK) e neutrófilos, alterar o equilíbrio de citocinas Tipo I e Tipo II e respostas imunes contudentes a antígenos primários e recordatórios in vivo. (SIMPSON; RICHARD, 2018)

O exercício prolongado e exaustivo normalmente reduz o número de células T tipo 1 e sua capacidade de produzir a citocina pró-inflamatória, o interferon- γ . Além disso, cargas pesadas de treinamento estão associadas a um elevado número de células T do sangue periférico em repouso e células T reguladoras, que caracteristicamente produzem citocinas anti-inflamatórias, interleucina 4 (IL-4) e IL-10, respectivamente (SHAW *et al.*, 2018).

A redistribuição destas células no compartimento vascular em resposta ao exercício parece ser mediada pela adrenalina, e em menor grau pela noradrenalina. A expressão de b-receptores nas diferentes células imunes pode fornecer a base molecular para ação das catecolaminas. Contudo, a densidade de receptores adrenérgicos e a eficiência do sistema de transdução AMPc diferem nos vários tipos de células imunocompetentes. Os neutrófilos e as células NK parecem apresentar maior número de receptores, sendo seguidos, por ordem decrescente, pelos linfócitos TCD8+, pelos linfócitos B e, finalmente, pelos linfócitos TCD4+. (LEANDRO *et al.*, 2007).

2.2.1 Exercício físico aeróbico

O American College of Sports Medicine define exercício aeróbico como qualquer atividade que utiliza grandes grupos musculares, pode ser mantido continuamente e é de natureza rítmica. Como o nome indica, os grupos musculares ativados por esse tipo de exercício dependem do metabolismo aeróbico para extrair energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos (PERINI *et al.*, 2016).

O exercício de resistência aeróbico induz aumentos adaptativos no conteúdo mitocondrial e na capacidade respiratória do músculo esquelético, bem como na concentração de mioglobina e no número capilar. Como consequência, o exercício

submáximo de mesma intensidade causa um menor distúrbio na homeostase, com uma utilização mais lenta do glicogênio muscular e da glicose sanguínea, uma maior dependência da oxidação de gordura e menos produção de lactato no estado treinado do que no não treinado. Essas adaptações desempenham um papel importante na explicação dos grandes aumentos na capacidade de trabalho que podem ser induzidos pelo treinamento (NIELSEN *et al.*, 1990).

O treinamento com exercícios aeróbicos leva ao remodelamento das proteínas do músculo esquelético e estimula várias etapas moleculares, incluindo a metilação do DNA e a síntese de novas proteínas. Muitos estudos demonstraram alterações no conteúdo de mRNA, mas a extensão em que as alterações transcricionais levam a alterações na abundância de proteínas permanece inconclusiva (ROBINSON *et al.*, 2017).

Há muitas evidências que indicam que o exercício físico aeróbico melhora volume de oxigênio máximo (VO₂max), essa melhora está associado a um risco reduzido na incidência de uma série de doenças relacionadas ao estilo de vida, incluindo câncer de mama, cólon e próstata, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e doença de Alzheimer. De acordo com isso, um nível extremamente baixo de consumo de oxigênio pode ter consequências graves, como aumento da incidência de doenças que levam à morte precoce (RADAK *et al.*, 2013).

2.2.2 Exercício físico resistido

O exercício anaeróbio tem sido definido pelo American College of Sports Medicine como atividade física intensa de muito curta duração, alimentada pelas fontes de energia dentro dos músculos em contração e independente do uso do oxigênio inalado como fonte de energia. Sem o uso de oxigênio, nossas células voltam à formação de ATP via glicólise e fermentação. Este processo produz significativamente menos ATP do que sua contraparte aeróbica e leva ao acúmulo de ácido láctico. Os exercícios normalmente considerados anaeróbicos consistem em músculos de contração rápida treinamento intervalado de alta intensidade e levantamento de peso (PATEL *et al.*, 2017).

Exercício resistido é o treinamento contra resistência, geralmente realizado com a utilização de pesos, e tem como benefícios: o desenvolvimento de potência, força e resistência muscular, diminuição de gordura corporal, e aumento de massa

magra e deste modo favorece uma melhor aptidão física e qualidade de vida por facilitar atividades do cotidiano como por exemplo carregar pesos, subir escadas, entre outros (CHAMARI; PADULO, 2015).

Treinamento resistido pode auxiliar na prevenção e controle do diabetes tipo 2, diminuindo a gordura visceral, reduzindo a Hemoglobina Glicada, aumentando a densidade do transportador de glicose tipo 4 e melhorando a sensibilidade à insulina. O treinamento de resistência pode melhorar a saúde cardiovascular, reduzindo a pressão arterial em repouso, diminuindo o colesterol de lipoproteína de baixa densidade e triglicerídeos, e aumentando o colesterol da lipoproteína de alta densidade. O treinamento resistido pode promover o desenvolvimento ósseo melhorando a densidade óssea (WESTCOTT, 2012).

O exercício físico resistido com diferentes tipos de cargas podem ter repercussões distintas no sistema imunológico. O exercício moderado parece melhorar os mecanismos de defesa do organismo, enquanto que o exercício intenso parece enfraquecê-los (VERÍSSIMO *et al.*, 2006).

2.3 Exercício Físico e Câncer Colorretal

Vários estudos epidemiológicos mostraram que o exercício regular pode atrasar o aparecimento de câncer de cólon e intestino. O exercício físico (treinamento aeróbico de longo prazo) demonstrou proteger significativamente contra a carcinogênese do cólon induzida quimicamente (HARRISS *et al.*, 2007).

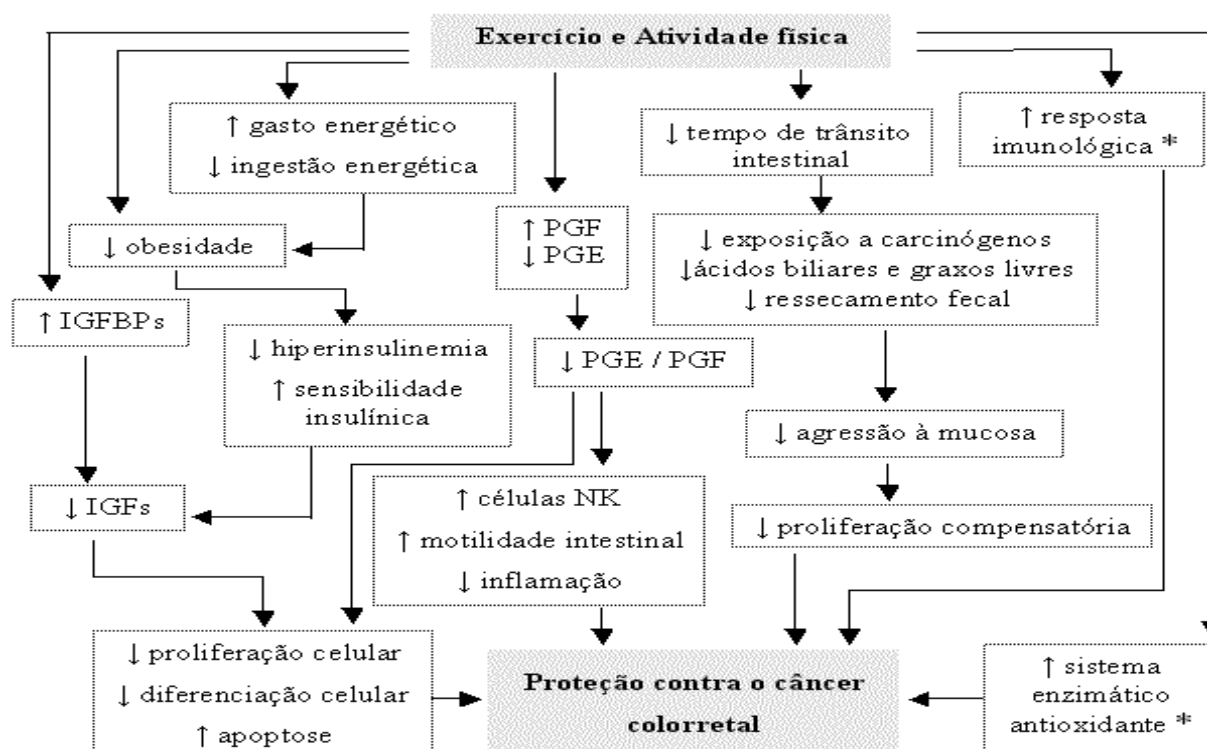
Células do músculo esquelético secretam proteínas bioativas de dentro da célula para o meio extracelular. A secreção de várias proteínas, cujos níveis aumentam em resposta ao exercício, pode regular as funções de vários órgãos pelas vias autócrina, parácrina e endócrina e mediar benefícios induzidos pelo exercício, como melhora metabólica, anti-inflamação e construção muscular; isso é conhecido como teoria das mioquinas (AOI *et al.*, 2013).

O exercício pode alterar os eventos de iniciação do tumor modificando a ativação do carcinógeno, especificamente melhorando o sistema do citocromo P450 e as enzimas seletivas na via de desintoxicação do carcinógeno, incluindo, entre outros, glutathione-S-transferases. Além disso, o exercício pode reduzir o dano oxidativo, aumentando o nível de uma variedade de enzimas antioxidantes,

melhorando os sistemas de reparo de DNA e melhorando os sistemas de reparo de proteínas intracelulares (SILVA; SIVIERI; ROSSI, 2009).

Estudos de intervenção em exercícios realizados em modelos de tumores de roedores mostram os potenciais efeitos mecanísticos do exercício na fisiologia do tumor. Foi demonstrado que o exercício reduz a incidência, a multiplicidade e o crescimento de tumores em vários modelos, como xenoenxerto, induzidos quimicamente ou genéticos. Efeitos mecanísticos emergentes do exercício, inclui vascularização e perfusão sanguínea, função imune, metabolismo de tumores e conversas cruzadas entre músculo e câncer (PEDERSEN; CHRISTENSEN; HOJMAN, 2015; RUIZ-CASADO *et al.*, 2017).

Figura11- ilustra os possíveis mecanismos de proteção contra o CC pelo exercício



Fonte: LUNZ; MOREIRA; VIANA, 2006.

2.4 Indução ao câncer colorretal em modelo animal

Os modelos animais são importantes para estudos do desenvolvimento e patogênese de tumores colorretais, bem como para a avaliação de possíveis fatores de risco, agentes preventivos e tratamentos. Como mostrado, alguns modelos individuais são representativos da CCR em seres humanos e considerados modelos animais bons para esse tipo de estudo. No entanto, nota-se que a associação de pelo menos dois métodos de indução de carcinógenos e colorretal é necessária para a maioria dos modelos. Isso se deve ao fato de que o câncer colorretal é doença multifatorial que se desenvolve pela presença de múltiplos fatores, tanto genéticos como ambientais (DE-SOUZA; COSTA –CASAGRANDE, 2018).

Uma vantagem dos modelos murinos é a disponibilidade de ampla informação genética em linhagens de camundongos individuais, a existência de painéis de camundongos consanguíneos recombinantes e o número cada vez maior de modelos genéticos transgênicos, knockout e knockin que estão disponíveis para estudo (TAHA *et al.*, 2020).

Os avanços da pesquisa durante a última década tenham levado a alguns dos avanços mais interessantes no tratamento do câncer, incluindo o bloqueio do ponto de controle imunológico, a maioria dos casos de CCR não responde a essas novas terapias. Esses estudos dependem fortemente de modelos pré-clínicos in vivo que recapitulam a biologia das doenças humanas (GOMES, 2012).

Vários modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando elucidar diversas questões referentes ao câncer in vivo. A utilização de animais como instrumentos de estudos biológicos ocorre de modo intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. Essa prática ocorre por diversas razões, dentre elas, o fato das linhagens de animais serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, além do fato de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos. (ONUHCIC; CHAMMAS, 2010)

Modelos induzidos por carcinógenos em roedores têm uma longa tradição, mas mantiveram sua utilidade para certas aplicações até os dias atuais. Eles fornecem uma plataforma para estudos dietéticos e fornecem informações sobre as vias de carcinógenos de origem alimentar e carcinogênese associada à colite. A administração dos compostos químicos é possível por meio de alimentação ad libitum, gavagem oral, injeção intraperitoneal / subcutânea ou intramuscular. (BÜRTIN; MULLINS, 2020).

Uma desvantagem notável desses modelos é a falta geral de fenótipo invasivo e metastático. No entanto, em geral, os modelos de roedores recapitulam a sequência adenoma-carcinoma encontrada no CCR humano (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

Os modelos de tumor de roedores usados atualmente, incluindo modelos de tumor transgênico ou tumores humanos de crescimento subcutâneo em camundongos imunodeficientes, não representam suficientemente o câncer clínico, especialmente no que diz respeito à metástase e sensibilidade a drogas. Para obter modelos clinicamente precisos, desenvolveram a técnica de implantação ortotópica cirúrgica para transplantar fragmentos histologicamente intactos de câncer humano (HOFFMAN, 1996).

Camadas monocelulares de tumores cultivados in vitro e xenoenxertos de camundongos derivados dessas células têm sido o kit de ferramentas padrão para

biologia do câncer por décadas. No entanto, os dados sugerem que o comportamento dessas linhas divergiu substancialmente dos tumores reais dos quais foram derivadas (SIOLAS; HANNON, 2013).

Estudos em modelos de camundongos de CCR induzidos quimicamente e geneticamente modificados aumentaram a compreensão da iniciação, progressão e resposta do tumor de cólon à terapia. Esses modelos continuam a desempenhar um papel essencial na avaliação de agentes quimiopreventivos, quimioterápicos e imunomoduladores promissores quanto à sua capacidade de impactar o desenvolvimento do tumor (DE ROBERTIS *et al.*, 2011; LEYSTRA; CLAPPER, 2019).

2.4.1 Modelo Xenoenxerto

Modelos de enxerto de tumor também conhecidos como xenoenxertos derivados do paciente (PDX), são baseados na transferência de tumores primários diretamente do paciente para um camundongo imunodeficiente. Como os camundongos PDX são derivados de tumores humanos, eles oferecem uma ferramenta para o desenvolvimento de terapias anticâncer e medicina personalizada para pacientes com câncer. Além disso, esses modelos podem ser usados para estudar metástases e evolução genética do tumor (SIOLAS; HANNON, 2013)

Foi desenvolvido o primeiro modelo Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) em camundongos nude utilizando a técnica de implantação cirúrgica ortotópica de tecido intacto de câncer colorretal. Uma maior ocorrência de metástases foi observada em modelos ortotópicos implantados com tecido tumoral intacto, com o seu micro-ambiente preservado, quando comparados com implantação de células tumorais (LIMA, 2018).

Os modelos PDOX podem ser uma boa oportunidade de se estudar os mecanismos de progressão tumoral por mimetizarem os padrões clínicos de metástases. Ainda, esta estratégia poderia permitir o estudo de resposta a diferentes fármacos simultaneamente no paciente e no modelo animal, a investigação de novos marcadores tumorais de resistência e susceptibilidade, e o teste de novas combinações de fármacos para vencer resistências (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2019).

2.4.2 Modelo de Câncer Colorretal Espontâneo em Animais

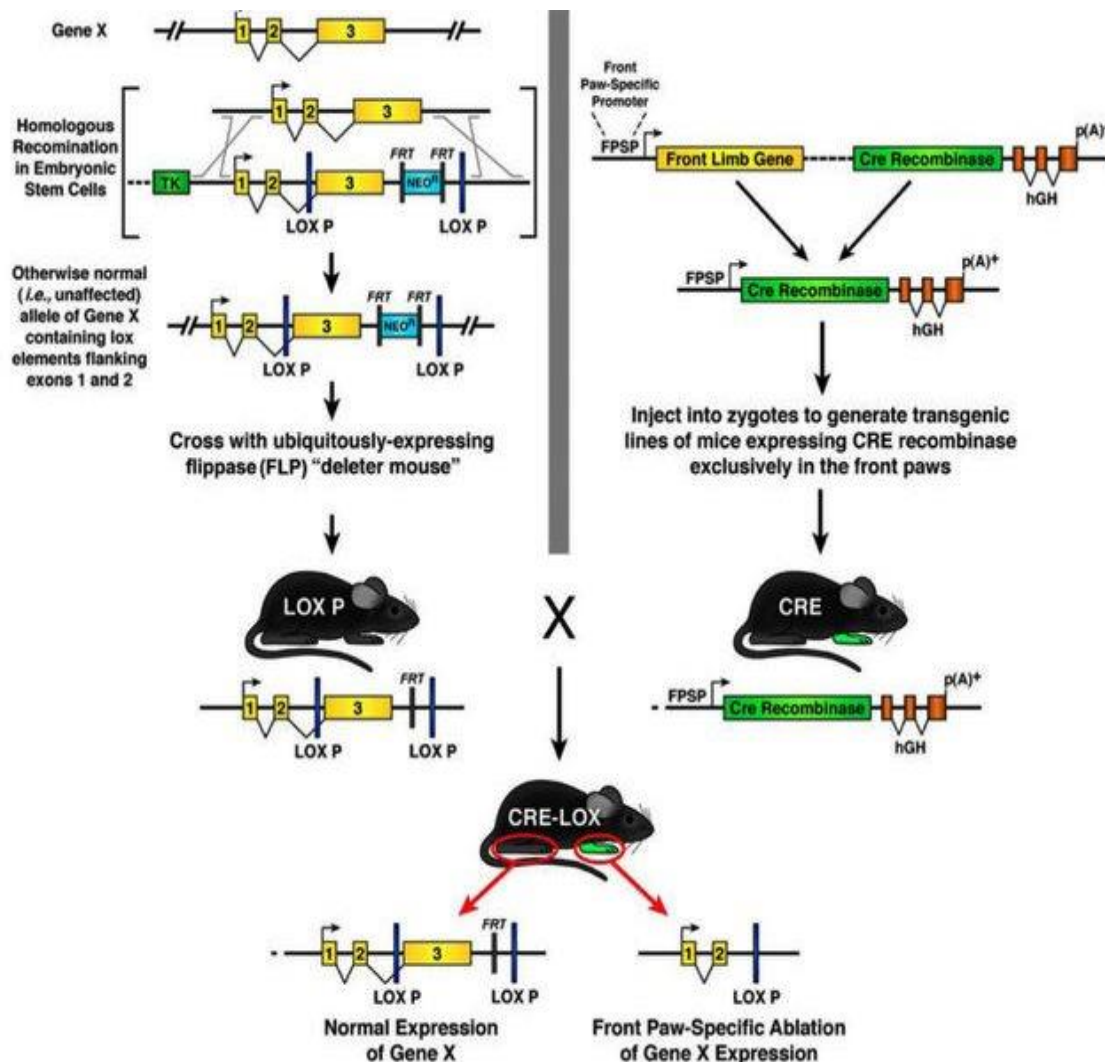
estratégias condicionais de genes *knock-in* e *knock-out* permitem a ativação ou inativação específica de um gene em um dado tecido e/ou em um dado estágio do desenvolvimento do câncer colorretal (LODISH *et al.*, 2014).

Animais *knock-in* e *knock-out* e mutantes condicionais, aliado à existência das mutações espontâneas, acelera o andamento de estudos sobre o fenótipo, isto é, como o impacto genotípico de diferentes mutações atua na função normal de genes críticos. Mesmo com os inúmeros mutantes já isolados e descritos, o termo "gap (buraco) fenotípico" é bem empregado para expor um estado de carência de animais mutantes, o que leva ao sub-aproveitamento do camundongo, modelo de camundongo transgênico que leva à expressão da proteína mutante linhas *knock-in* ou à perda de função e linhas *knock-out* funcionais que combinada com carcinógenos pode potencializar o desenvolvimento do câncer colorretal (REIS, 2006; BOUHY *et al.*, 2018)

Nas últimas três décadas, estudos de genética molecular revelaram algumas mutações críticas subjacentes à patogênese das formas esporádicas e hereditárias de câncer colorretal. Um número relativamente limitado de oncogenes e genes supressores de tumor, mais proeminentemente os genes APC, KRAS e p53 - são mutados em uma fração considerável de CCR e uma coleção maior de genes que são mutados em subconjuntos de CCR começaram a ser definidos. Junto com a metilação do DNA e mudanças na estrutura da cromatina, as mutações agem para desregular redes de sinalização conservadas que exercem efeitos dependentes do contexto em fenótipos celulares críticos, incluindo a regulação do metabolismo celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência (FEARON, 2011).

Camundongo $Apc^{Min/+}$ é um excelente modelo animal com neoplasia intestinal múltipla, usado para simular polipose adenomatosa familiar humana e tumores colorretais. (REN *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2016).

Figura 12- Desenvolvimento de camundongos nocauteados condicional (com ablação temporal, celular e / ou específica de tecido da expressão gênica.



FONTE: DOYLE et al., 2012.

O camundongo *Hairless* possui uma baixa resposta imunológica devido à deficiência de células T helper, (ANDRADE, 2002). Os linfócitos T *helper* podem ser classificados em células Th1 e células Th2. De acordo com os estímulos recebidos linfócitos Th1, secretam interferon- γ , fator de crescimento transformador beta, TNF α e IL-2, que colaboram com a função citotóxica dos linfócitos CD8⁺, induzem a autorregulação do processamento de antígeno nos proteossomos, induzem a expressão MHC de classe I e II e podem induzir outros antígenos relacionados a células neoplásicas, apesar de não indicarem uma verdadeira imunodeficiência, à ausência de células T *helper* no camundongo *Herless* pode favorecer o

desenvolvimento do CCR, com isso possibilitando uma maior taxa de positividade (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; DENARDO; COUSSENS, 2007).

2.4.3 Modelo quimicamente induzido

Uma vez que diferentes compostos químicos causam diferentes mutações, a utilização de mutagênicos químicos resulta na geração de uma variedade de tumores. Consequentemente, os tumores induzidos quimicamente imitam a ampla gama de alterações genéticas encontradas no CCR esporádicos. Além disso, a indução química de tumores intestinais pode ser usada para estudar as propriedades tumorigênicas de substâncias químicas comumente encontradas na dieta humana ou no ambiente. (STASTNA *et al.*, 2019)

No entanto, como em humanos, a interpretação dos dados do estudo resultante é frequentemente comprometida pela variabilidade interindividual significativa no desenvolvimento do tumor e na resposta à terapia (LEYSTRA; CLAPPER, 2019).

A tumorigênese e a resposta à terapia em humanos e camundongos são influenciadas pelo microambiente em que o tumor de cólon surge. As interações complexas entre a microbiota comensal e as células imunes residentes no tecido dentro do cólon fornecem um microambiente dinâmico que está bem equipado para responder rapidamente aos estímulos. Perturbações no microambiente impactam diretamente a homeostase do epitélio colônico e ditam a propensão para doenças. Apesar das evidências crescentes do papel crítico que a microbiota residente desempenha em influenciar a frequência de iniciação do tumor, a taxa de progressão e a resposta à terapia, há uma subavaliação desses fatores ao selecionar e desenvolver modelos animais de CCR (FREITAS *et al.*, 2011).

Há uma série de vantagens em estudar a patogênese do câncer de colorretal induzido por carcinógeno em modelos de roedores. Os modelos são altamente reprodutíveis, podem ser testados prontamente em animais com diferentes origens genéticas e a patogênese recapitula o CCR humano, pelo menos nos estágios iniciais (ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009).

Historicamente, a maioria dos estudos de carcinogênese do cólon foi realizada em ratos. No entanto, a alta frequência de tumores gerados no cólon distal de camundongos, bem como a histogênese de múltiplos adenomas com posterior

desenvolvimento de adenocarcinomas, também validam a importância desta espécie para o estudo da patogênese do câncer de colorretal (DE ROBERTIS *et al.*, 2011).

2.4.3.1 Modelo quimicamente induzido por 1,2-dimetilhidrazina

O modelo de rato 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) provou ser um modelo animal valioso de câncer colorretal. Devido à sua semelhança morfológica com o câncer colorretal humano, o modelo de rato DMH foi usado para produzir informações em histologia e bioquímica do desenvolvimento de tumores, bem como sobre fatores que retardam ou aumentam a tumorigênese (PERSE, CERAR, 2007). DMH em metabólito carcinogênico sem metabolismo prévio por outros tecidos ou bactérias do cólon. O procarcinogênio DMH, após uma série de reações metabólicas, finalmente atinge o cólon, produzindo as espécies cancerígenas e ROS finais, que alquilam ainda mais o DNA e iniciam o desenvolvimento da carcinogênese do cólon (VENKATACHALAM *et al.*, 2020).

O metabólito carcinogênico final do DMH é responsável pela metilação das bases do DNA de vários órgãos, incluindo células epiteliais no compartimento proliferativo das criptas, o que resulta em uma grande perda de células colônicas por apoptose, um aumento na proliferação e um aumento aparente em mutações de células epiteliais do cólon (PERŠE; CERAR, 2011).

A maioria desses tumores *possui* mutações no gene da β -catenina Catenin Beta 1 (CTNNB1), que é semelhante ao HNPCC. Essas mutações afetam os aminoácidos N-terminais do produto do gene β -catenina, tornando a proteína resistente à degradação regulatória, estabilizando a β -catenina e aumentando a sinalização WNT para conduzir a tumorigênese. Além disso, a incidência e multiplicidade do tumor podem ser alteradas tanto pela base genética quanto pela dieta (OGATA *et al.*, 2010).

2.4.3.2 Modelo quimicamente induzido por 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine

PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina) é uma amina heterocíclica produzida durante o cozimento de carne e peixe que é um mutagênico causador de câncer de cólon em ratos. Em camundongos, a PhIP induz a formação de focos de cripta aberrantes do cólon, mas não de tumores de cólon. No entanto, a

combinação de PhIP com o tratamento Sulfato De Dextrano De Sódio (DSS) ou o tratamento de camundongos *Apc^{Min}* com PhIP pode aumentar a tumorigênese (JOHNSON; FLEET, 2013; NICKEN *et al.*, 2013).

PhIP tem ação estrogênica, estimula a proliferação celular de uma maneira dependente de Estrogen Receptor (ER) e ativa a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) através da indução de mRNA dos genes *PR* e *c-myc*. (NAKAGAMA; NAKANISHI; OCHIAI, 2005).

2.4.3.3 Modelo quimicamente induzido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

Um composto com ação carcinogênica química direta com alta afinidade e capacidade de metilação para regiões específicas no DNA. Em baixas concentrações, esse agente é capaz de induzir a formação de focos de criptas aberrantes no epitélio colônico, que são lesões pré-neoplásicas com grandes chances de transformação maligna (MACHADO *et al.*, 2020).

A injeção de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) também induz câncer de próstata e de mama infelizmente, a alta incidência de neoplasia extracolônica induzida por esses compostos nitrosos é uma variável de confusão neste modelo. Quando administrado via reto, o MNNG causa reprodutivelmente uma alta incidência de câncer de colorretal, mas ainda induz linfoma tímico e câncer pulmonar que podem causar mortalidade (NARISAWA *et al.*, 1976).

2.4.3.4 Modelo quimicamente induzido por azoximetano

O CCR induzido pelo azoximetano (AOM) em roedores é um modelo bem estabelecido e comumente usado para o estudo da biologia molecular, prevenção e tratamento do CCR. Este modelo imita características histopatológicas altamente semelhantes e compartilha vias moleculares semelhantes ao fenótipo esporádico de CCR em humanos (Chan; Cook; Stanners, 2006). AOM, um metabólito ativo de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), é um carcinógeno específico do cólon que serve como uma ferramenta eficaz para avaliar tumores de cólon em roedores suscetíveis (BOATENG *et al.*, 2007).

Após a administração, o AOM é metabolizado em metilazoximetanol pelo Citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que causa mutações no DNA. A mutação de K-ras ativa esta via e sua via PI3K / Akt a jusante e via MAPK. A mutação de β -catenina

também evita que ela seja degradada por GSK-3 e o acúmulo de β -catenina leva à proliferação celular. O TGF β , uma proteína pró-apoptótica, é inibido. Todas essas mudanças formam a base da carcinogênese da OMA (CHEN, HUANG, 2009; AVELINO, 2020). O adutos de metilguanina no DNA resultando em transições G→A após a excreção na bile, é absorvida pelo epitélio colônico e induz a mutagênese.

2.4.3.6 Modelo quimicamente induzido por azoximetano e sulfato de dextrano de sódio

A combinação de DSS com AOM como modelo para câncer associado à colite ganhou popularidade por sua reprodutibilidade, potência, baixo preço e facilidade de uso. Embora tenham um mecanismo compartilhado, descobriu-se que o AOM é mais potente e estável em solução do que o DMH. Enquanto o desenvolvimento do tumor em outros modelos geralmente requer vários meses, os camundongos injetados com AOM e subsequentemente tratados com DSS desenvolvem tumores adequados em apenas 7 a 10 semanas relataram algumas características comuns compartilhadas por CCR humano e de camundongo, como mutação ou desregulação de KRAS e CTNNB1 (THAKER *et al.*, 2018).

O benefício de utilizar o tratamento combinado de AOM + DSS é que ele permite a avaliação do CCR iniciado com mutações esporádicas produzidas pela AOM, enquanto induz uma resposta inflamatória cuja gravidade depende da dose de DSS (PAN *et al.*, 2017).

Os principais recursos do modelo AOM / DSS incluem sua linha do tempo relativamente curta e modelagem precisa do CCR. O desenvolvimento do tumor pode ocorrer em até 10 semanas. Além disso, a histopatologia de tumores induzidos por AOM / DSS recapitula facetas-chave do CCR humano, como tumores localizados distalmente e adenocarcinomas invasivos. A aplicação do modelo AOM / DSS foi crítica para desvendar a patogênese do CCR do papel das vias de sinalização (por exemplo, receptor semelhante a Toll 4, IKK β e IL-6 e maquinaria antioxidante (por exemplo, glutational peroxidase à influência da microbiota e corepressores transcrpcionais , genes de translocação mieloide. Assim, o modelo AOM / DSS é uma plataforma poderosa a ser empregada no estudo da patogênese do câncer colorretal inflamatório (PARANG;BARRETT; WILLIAMS, 2016).

2.5 Exercício físico em Modelo Animal

Modelos de exercícios físicos têm sido desenvolvidos para estudos em animais para simular atividades físicas de humanos. Esses modelos animais de exercício físico incluem uma escala de baixa a alta intensidade, intermitente a sustentada, durações curtas a longas e diferentes modos de atividade (THU; KIM; HAN, 2017).

Um dos pontos mais relevantes da utilização de roedores para o estudo do exercício é a similaridade fisiológica apresentada por esses animais, quando comparadas a humanos, submetidos a exercício agudo e crônico. O comportamento equiparado entre esses dois grupos sugere a possibilidade da aproximação entre as descobertas sobre exercício físico com roedores a humanos. A relativização se faz necessária por meio de adequações, dado o maior controle que é possibilitado quando os animais são o objeto de estudo (GOBATTO *et al.*, 2008).

Os modelos para induzir exercícios em animais são altamente variáveis e inclui natação, subida em escada vertical, levantamento de peso, corrida voluntária em rodas e corrida em esteira. Pode-se observar na literatura que nem todos esses modelos são frequentemente usados para estudar as adaptações fisiológicas do exercício físico (BARBOSA; LIMA, 2016). Os pesquisadores propuseram várias terminologias para identificar essa transição aeróbio-anaeróbia no exercício físico em modelo animal através da máxima fase estável de lactato foi estabelecido que concentrações de 4 mmol / L de lactato sanguíneo poderiam ser determinadas em exercícios de intensidade constante.

Embora o exercício físico possa ser reconhecido como um tipo de estresse, o exercício voluntário é a intervenção mais eficaz para diminuir a resposta ao estresse do que o exercício forçado ou involuntário. Os modelos de exercícios aeróbicos incluem corrida em esteira, corrida em roda, e natação. Esses modelos são amplamente usados para investigar os determinantes do desempenho do exercício ou os efeitos da intervenção em várias condições patológicas (ARIDA *et al.*, 2011).

O exercício físico funciona como um processo fisiopatológico que pode prevenir controlar e regular várias condições crônicas. Devido à ética da pesquisa e às dificuldades técnicas em humanos, os modelos de exercícios usando animais são

necessários para o futuro desenvolvimento de miméticos de exercícios para tratar tais anormalidades.

Em roedores, a corrida em esteira, natação, escalada em escada vertical e corrida em roda voluntária são amplamente utilizadas como modelos de exercícios aeróbicos e anaeróbios, respectivamente (SEO *et al.*, 2014).

2.5.1 Corrida em esteira motorizada

A corrida em esteira é usada para ratos e camundongos, a intensidade do exercício é facilmente determinada e pode ser aumentada pelo simples aumento da velocidade. No entanto, algumas desvantagens do uso da corrida em esteira podem ser elencadas, entre elas: equipamento de alto custo, dificuldade de manutenção e controle da velocidade, seleção de animais (corredores) e exigida a presença de estímulo elétrico como fator de estresse (CONTARTEZE *et al.*, 2008).

Figura 13- Exercício em esteira motorizada.



Fonte: FAN *et al.*, 2017.

2.5.2 Corrida voluntária em roda

A corrida voluntária em roda ocorre dentro das atividades comuns do roedor, uma vez que ele escolhe em qual momento irá praticar a atividade, evitando o estresses de realizar o exercício forçadamente evitando resposta fisiológicas que podem interferir em adaptações agudas e crônicas do exercício (STRAPAZZON, 2020).

A grande vantagem do exercício em roda de corrida é que ele pode ser conduzido sem um período de aclimação e não necessita da presença constante do pesquisador, visto que as rodas permanecem nas caixas dos animais durante todo o período experimental, assim diminuindo o contato dos animais com os

pesquisadores consequentemente diminuindo os estresses causado aos animais (BAVARESCO, 2015).

Figura 14- Exercício físico corrida voluntária em roda.



Fonte: PINTO, 2015.

2.5.3 Natação

Natação é um exercício físico muito utilizado no modelo animal, devido ao aspecto positivo desse método de treinamento está na habilidade dos ratos e camundongos de nadar. Estudos utilizando a natação revelaram a ocorrência de adaptação ao treinamento físico semelhante às observadas em seres humanos. Apesar dessas vantagens, alguns autores criticam as pesquisas que utilizam esse tipo de exercício argumentando, a influência da temperatura da água, estresse causado pelo exercício, alguns pesquisadores acreditam que os animais lutam para sobreviver na água em vez de realizar apenas exercício físico (VOLTARELLI *et al.*, 2002; VESKOUKIS *et al.*, 2018).

Estudos mostram que o exercício físico de natação em modelo animal pode se considerado tanto como aeróbio como anaeróbio, dependendo da duração e intensidade da sessão de treinamento , como mostrado no estudo de Gobatto *et al.*,(2007) os camundongos foram submetidos a cinco testes contínuos (exercício de natação) em intensidades equivalentes a 3, 4, 5, 6 e 7% do massa corporal, durante 25 min cada teste, para determinação da máxima fase estável de lactato. Houve coleta de sangue em repouso, 5, 10, 15, 20 e 25min de exercício. A máxima fase estável de lactato foi determinada na intensidade de 4,0% do massa corporal, na concentração de lactato de $5,20 \pm 0,22$ mmol/L.

Figura 15- Exercício físico natação.



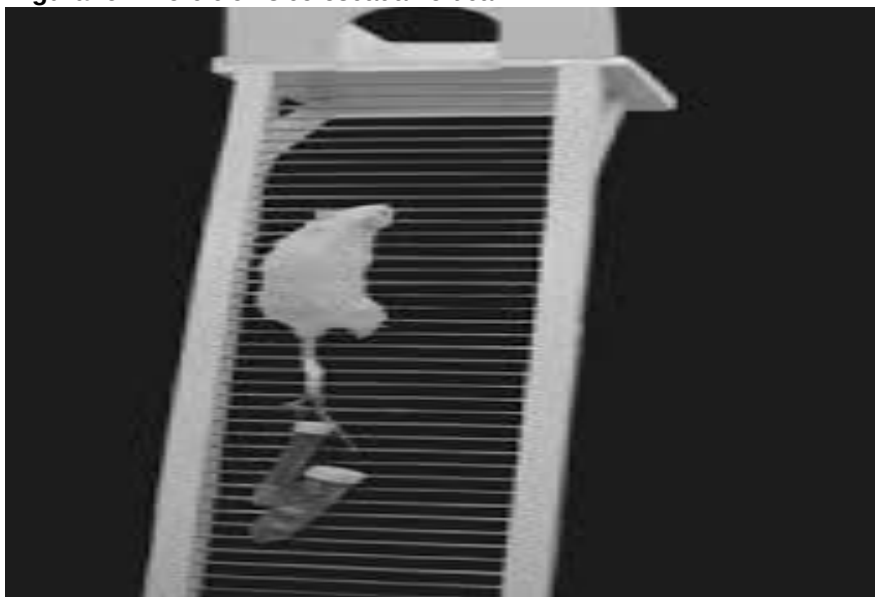
Fonte: SCOMAZZON, 2015.

2.5.4 Escada Vertical

A escalada em escada vertical é um dos modelos mais populares de exercícios de resistência. A maioria dos procedimentos usando escalada de escada vertical começa com o animal posicionado na parte inferior de uma escada vertical (inclinação de 80-90; 50 a 100 cm de altura) com cargas variáveis anexadas à cauda (STRICKLAN; SMITH, 2016).

O treinamento de força (TR) em escada vertical em animais foi criado por alguns laboratórios para melhorar suas semelhanças com o treinamento de força realizado por humanos. Esses modelos fornecem um meio excelente para estudar as respostas agudas e crônicas do TR nos músculos. No entanto, esses modelos ainda têm o desafio de treinar os animais para realizar voluntariamente os exercícios tradicionais realizados por humanos. Em alguns casos, os animais recebem comida como recompensa ou o movimento é estimulado por um choque elétrico na cauda, mas não diretamente no tecido muscular como nos modelos animais inconscientes anteriores (MELO *et al.*, 2018).

Figura16- Exercício físico escada vertical.



Fonte: RODRIGUES; BORIN; SILVA, 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do exercício físico aeróbico e resistido no desenvolvimento do câncer colorretal induzido por e Azoximetano (OAM) associado à colite em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o desenvolvimento do câncer de colorretal associado a colite em camundongos com a prática de exercício físico aeróbico e resistido antes e após a indução do tumor.

Avaliar o desenvolvimento do câncer de colorretal associado a colite em camundongos com a prática de exercício físico aeróbico e resistido após a indução do tumor.

Avaliar o desenvolvimento do câncer de colorretal em grupo de camundongos com a prática de exercício físico aeróbico e resistido após a indução do tumor.

Descrever as alterações morfológicas macroscópicas e histológicas ocorridas nos cólons dos grupos de camundongos de diferentes métodos de prática de exercícios e sedentários.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de pesquisa

Trata-se de um estudo experimental em modelo animal.

4.2 Local de Pesquisa

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Modelos Experimentais de Doenças e Laboratório de Carcinogênese Experimental do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da FAMED/UFMS.

4.3 Aspectos éticos

Todas as etapas e procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional De Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram protocolados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (CEUA -UFMS) nº 1.091/2019 (anexo 1), sendo realizados após aprovação na mesma.

4.4 Animais

Os camundongos *hairless* machos foram recebidos do biotério da UFMS com 4 semanas de idade e peso inicial de 25g.

Foram utilizados 50 animais, no quais 10 animais foram utilizados como grupo piloto para definição dos protocolos de exercício físico. Os 50 animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40x35x17 cm), na quantidade de quatro animais/gaiola, todas as caixas alojadas na mesma prateleira com altura de 1 metro do chão e exposição à luz de maneira igual a todas as gaiolas, à temperatura de aproximadamente 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL® CR1) e água à vontade. Os mesmos foram aclimatados às condições do laboratório durante 14 dias antes do experimento.

O número de animais por grupo foi calculado considerando um $p < 0,05$, poder de teste de 95% desvio máximo de 15% e uma diferença máxima entre grupos de 30%, e devido ao procedimento de indução tumoral com o Azoximetano possuir uma

toxicidade, considerando perder até 20% dos animais durante o experimento. Sendo assim, o número total de animais e o número de animais por grupo foi calculado seguindo a seguinte formula $N=n+N \times f$ (ENG,2003).

4.4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 animais para o experimento de câncer associado a colite e exercício físico, divididos em 5 grupos de maneira aleatória.

Grupo G1: animais submetidos ao exercício aeróbico pré e pós indução tumoral, da semana 1 a semana 14 (n=8).

Grupo G2: animais submetidos ao exercício resistido pré e pós indução tumoral, da semana 1 a semana 14 (n=8).

Grupo G3: animais submetidos ao exercício aeróbico pós indução tumoral, da semana 7 a semana 14 (n=8).

Grupo G4: animais submetidos ao exercício resistido pós indução tumoral, da semana 7 a semana 14 (n=8).

Grupo G5: animais sedentários induzidos ao câncer, não praticaram exercício da semana 1 a semana 14 (n=8).

4.5 Protocolos de exercício físico

Os protocolos de exercícios foram realizados em dias alternados. O exercício físico aeróbico foi a prática de natação, e o exercício resistido foi subida em escada vertical para camundongos.

O modelo de natação em camundongos foi baseado no estudo adaptado de Zhou *et al.*, (2019). Foi realizado em um tanque de 29 litros água aquecida (31 ± 2 C) com dimensões: altura 27,6 cm, largura 33 cm. Os animais nadaram em grupos de 4 camundongos. A temperatura da água foi monitora por Termômetro (Modelo Laboratório -10°C A +110°C - Brax Tecnologia).

O modelo de treinamento resistido em escada vertical, foi baseado e adaptado no estudo Guedes *et al.*, (2020), o protocolo consiste nos animais escalarem uma escada vertical com pesos atados em suas caudas até alcançarem o topo da escada. No topo, os camundongos alcançavam um compartimento. Altura total: 110 cm, base: 30cmx35 cm, largura:10 cm, degraus confeccionados em barra de inox, distância entre os degraus: 1cm, Inclinação 80 graus.

Durante o procedimento de exercício físico os animais do grupo 5 foram mantidos em uma caixa ao lado dos animais de exercitados, afim de manter a exposição aos pesquisadores iguais entre os grupos.

4.5.1 Critérios de avaliação e interrupção do exercício

Durante a natação os animais que apresentavam dificuldade em se manter na superfície da água, foram retirados da sessão de treinamento, o critério para interrupção do nado, foi submersão por 5 segundos, os animais submersos eram estimulados a retornar a superfície da água, caso permanecessem em submersão por 5 segundos eram retirados da sessão de treinamento. Caso o animal não conseguisse completar duas sessões de treinamentos consecutivos o animal seria excluído da amostra.

Durante o exercício de escada vertical, os animais que apresentavam dificuldade em subir a escada foram retirados da sessão de treinamento, em caso de queda os animais eram examinados e retornavam ao exercício na subida seguinte. O critério para interrupção foi o animal permanecer parado por 30 segundos durante a subida, o animal recebia 3 toques em sua calda, caso não houvesse progressão na subia após 30 segundos o animal foi retirado da sessão de treinamento.

Caso o animal não conseguisse completar duas sessões de treinamento consecutivos o animal seria excluído da amostra.

Quadro 1- Cronograma geral da pratica de exercício físico.

Adap.	Sem.1	Sem. 2	Sem.3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7
grupo 1 e 2	Início do protocolo de exercícios Grupo 1 e 2	Exercício grupo 1 e 2	Exercício grupo 1 e 2	Exercício grupo 1 e 2	Exercício grupo 1 e 2	Exercício grupo 1 e 2 Adaptação grupo 3 e 4	Exercício grupo 1 e 2 Início do exercício grupo 3 e 4

Adap.= adaptação, Sem= semana.

Quadro 1.1- Continuação do cronograma geral da pratica de exercício físico.

Sem. 8	Sem. 9	Sem. 10	Sem. 11	Sem. . 12	Sem. 13	Sem. 14
Exercício	Exercício	Exercício	Exercício	Exercício	Exercício	Exercício

Sem= semana.

4.5.2 Adaptação natação

O grupo 1 iniciou a adaptação 6 dias antes do início do protocolo de natação. O grupo 3 iniciou a adaptação na semana 6 do experimento.

O programa de adaptação à natação: seguiu no primeiro e segundo dias adaptação com o local do nado por 5 minutos sem água.

Terceiro dia foi colocado água aquecida (31 ± 2 °C) com 1 cm de profundidade com duração de 5 minutos.

Quarto dia foi colocado 5 cm de água aquecida (31 ± 2 °C) por 5 minutos.

Quinto e sexto dia foi colocado 15 cm de água aquecida (31 ± 2 °C) por 5 minutos para que os animais não tocassem o fundo do tanque.

A adaptação teve como objetivo reduzir o estresse induzido pela água sem promover alterações fisiológicas em relação ao treinamento físico (Liu *et al.*, 2018).

4.5.3 Protocolo de natação

Os animais dos grupos 1 e 3 de natação, realizaram treinamento crônico de natação em um tanque de água aquecida (31 ± 2 °C), em dias alternados, sendo o grupo 1 (pré e pós indução) durante 14 semanas, e o grupo 3 (pós indução) durante 7 semanas. Não houve utilização de cargas de peso.

Durante o período de treinamento, a duração das tarefas de natação foram gradualmente aumentadas, de 10 minutos iniciais, sendo aumentado 5 minutos a cada 3 semanas. O grupo 1 (pré e pós indução), iniciou nado por 10 minutos (primeira a terceira semana), 15 minutos (quarta a sexta semana), 20 minutos (sétima a nona semana), 25 minutos (da décima primeira a décima segunda), 30 minutos (décima terceira a décima quarta semana).

O grupo 3 (pós indução) iniciou na sétima semana com 10 minutos de nado (sétima a nona semana), 15 minutos (décima a décima segunda semana), 20 minutos (décima terceira semana a décima quarta semana).

Quadro 2- Cronograma de natação.

Adap.	Sem.1	Sem. 2	Sem.3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7
G1= Adaptação	G1= 10 min.	G1= 10 min.	G1= 10 min.	G1= 15 min.	G1= 15 min.	G1= 15min. G3= adaptação	G1= 20 min. Início G3= 10 min.

Adap= adaptação, Sem= semana.

Quadro 2.1- Continuação do cronograma de natação.

Sem. 8	Sem. 9	Sem. 10	Sem. 11	Sem. 12	Sem. 13	Sem. 14
G1= 20 min.	G1= 20 min.	G1= 25 min.	G1= 25 min.	G1= 25 min.	G1= 30 min.	G1= 30 min.
G3= 10 min.	G3= 10 min.	G3= 15min.	G3= 15min.	G3= 15min.	G3= 20 min.	G3= 20 min.

Sem= semana

4.5.4 Adaptação ao exercício resistido escada vertical

Na semana anterior ao início do exercício físico do protocolo de escada os animais foram adaptados à subida em escada, inicialmente sem peso, progredindo com peso de forma progressiva por 6 dias. Para isso, a escada foi marcada em três partes iguais, assim o animal foi colocado no compartimento do topo da escada por 2 minutos e, em seguida, colocado para subir por três vezes o primeiro terço (33,3 cm), descansou por 2 minutos, e em seguida, subiu três vezes o segundo terço (66,6 cm), descansou por 2 minutos e terceiro terço (100 cm) da escada. Sempre descansando no compartimento do topo da escada.

Do primeiro ao terceiro dia da adaptação, o exercício físico foi realizado sem peso.

No quarto dia foi colocado tubo sem peso na cauda dos animais, e realizada três subidas completas da escada.

Quinto e sexto dia foi colocado um tubo contendo 2% da massa corporal.

4.5.5 Protocolo de exercício resistido escada vertical

Exercício resistido de escada vertical foi realizado 10 repetições de subida até o topo da escada com 2 minutos de intervalo, em dias alternados. O grupo 2 (pré e pós indução), durante 14 semanas, chegou a 50% de carga, e o grupo 4 (pós indução) durante 7 semanas, chegou 30% de carga.

Os animais do grupo 2 foram submetidos ao treinamento resistido, no qual a carga inicial foi aumentando progressivamente iniciando com:

10% da massa corporal (primeira a terceira semana).

20% da massa corporal (quarta a sexta semana).

30% da massa corporal (sétima a nona semana).

40% da massa corporal (décima a décima segunda semana),

50% da massa corporal (décima terceira a décima quarta semana).

O grupo 4 iniciou adaptação na sexta semana, dando início ao treinamento resistido na sétima semana iniciando com a carga de:

10% da massa corporal (sétima a nona semana).

20% da massa corporal (décima a décima terceira semana).

30 % (décima terceira a décima quarta semana).

Quadro 3- Cronograma de escada vertical.

Adap.	Sem.1	Sem. 2	Sem.3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7
G2= Adapta ção	G2=10% da massa corporal	G2=10% da massa corporal	G2=10% da massa corporal	G2=20% da massa corporal	G2=20 da massa corporal	G2=20% da massa corporal	G2=30% da massa corporal
						G4=adapt ação	Início G4 =10% da massa corporal

Adap.= adaptação, Sem= semana.

Quadro 3.1- Continuação do cronograma de escada vertical.

Sem. 8	Sem. 9	Sem. 10	Sem. 11	Sem. 12	Sem. 13	Sem. 14
G2=30 % da massa corporal.	G2=30 % da massa corporal.	G2=40 % da massa corporal.	G2=40 % da massa corporal.	G2=40 % da massa corporal.	G2=50 % da massa corporal	G2=50 % da massa corporal
G4=10% da	G4=10% da	G4=20% da	G4=20% da	G4=20% da	G4=30% da massa	G4=30% da massa

massa corporal	massa corporal	massa corporal	massa corporal	massa corporal	corporal	corporal
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	----------	----------

Sem= semana.

4.6 Indução da colite e câncer colorretal

4.6.1 Indução da colite

Para a indução apenas da colite foi disponibilizado aos camundongos de ambos os grupos, ad libitum por 3 ciclos de 5 dias consecutivos, água contendo Dextran Sulfato de Sódio (DSS) solução DSS 2,5% (12 g/250 ml) em água destilada, intercalados por 2 semanas de água normal, com a finalidade de induzir inflamação intestinal (KIM *et al.*, 2012). Para fornecer um suprimento contínuo de DSS por 5 dias, a solução DSS foi substituída em frascos limpos a cada 1 dia durante esse período do ciclo. Foi medida a quantidade de DSS consumida em cada troca de frasco como medida de exposição. Primeiro ciclo foi realizado na semana 2, segundo ciclo semana 5 e terceiro ciclo semana 8.

Quadro 4- Cronograma de indução ao câncer colorretal

Adap.	Sem.1	Sem. 2	Sem.3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7
	Observação	1° ciclo DSS	1° dose AOM	2° dose AOM	2° ciclo DSS	Observação	Observação

ADAP.= adaptação, Sem = semana

Quadro 4.1- Continuação do cronograma de indução ao câncer colorretal

Sem. 8	Sem. 9	Sem . 10	Sem . 11	Sem . 12	Sem . 13	Sem . 14
3° ciclo DSS	Observação	Observação	Observação	Observação	Observação	Observação Eutanásia

Sem = semana

4.6.2 Indução ao câncer colorretal

Para a indução ao câncer todos os animais receberam duas injeções intraperitoneal (Quadrante inferior direito do abdome) de axozimetano (AOM – Laboratório Sigma-Aldrich) utilizando-se seringa de 1 ml e agulha 25x5 mm. dose total de 20 mg/Kg, fracionadas em duas semanas, 10 mg/kg diluído em 1 ml de solução salina isotônica por semana de solução de AOM (mantido -20° C) .Primeira dose semana 3 e segunda dose semana 4.

4.7 Avaliação da indução de colite e câncer

Baseado no protocolo de avaliação de Snider *et al.*, (2016), a partir do primeiro ciclo de Dextran Sulfato de Sódio (DSS) os animais nos dias 2 a 4 dos ciclos de tratamento (DSS), como um indicador de indução de colite e câncer, os

camundongos poderiam ter perdido aproximadamente 10% de sua massa corporal e apresentarem regulares sangramento retal, diarreia ou prolapso. Durante a avaliação de cada animal as manchas de sangue que não forem óbvias na região anal, foram coletadas as fezes dos animais para determinar a presença de sangue oculto, usando o peróxido de hidrogénio em solução aquosa. Às fezes foram colocadas em um Becker de vidro 150 ml contendo peróxido de hidrogénio (THAKER *et al.*, 2012)

4.8 Eutanásia

Na décima quarta semana, os animais foram submetidos à eutanásia. Para isso os animais serão submetidos à anestesia geral inalatória (isoflurano) seguida de exsanguinação de acordo com as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Para confirmar a morte dos animais foram considerados ausência de movimento respiratório e batimentos cardíacos.

4.9 Coleta e armazenamento dos cólons

O procedimento de coleta dos cólons foi baseado no estudo de Thaker *et al.*, (2012). Usando uma pinça de dissecação e uma tesoura, foi feita uma incisão na pele do lado abdominal. Com uma pinça, segurou-se a pele na incisão e puxada suavemente para longe do tecido muscular abdominal, usando uma tesoura para cortar a pele abdominal e expor os músculos abdominais, segurou-se e puxado o peritônio com a pinça. Foi feita uma incisão no tecido peritoneal com cuidado e continuando cortando para expor os intestinos. Identificado o cólon, foi identificado a extremidade distal, onde se junta ao reto / ânus. Com uma tesoura, foi realizado um corte o mais próximo possível da abertura anal. Com uma das mãos segurou-se a extremidade distal do cólon e, com a outra mão, esticando suavemente o cólon e desconectado de qualquer tecido conjuntivo mesentérico e / ou gordura. Identificou-se o ceco (pequena bolsa entre os intestinos delgado e grosso) e cortou-se no local onde o ceco e o cólon se unem (a extremidade proximal do cólon) para liberar o cólon. Para limpeza do tecido usou-se uma seringa de 10 ml com solução formalina tamponada a 10%, e conectou-se uma agulha de gavagem. Foi inserida a agulha cerca de meio centímetro na abertura anterior do cólon, com os dedos de uma das mãos, segurou-se a agulha dentro do cólon aplicando uma pressão firme no cólon; com a outra mão segurando a seringa, aplicou-se uma pressão suave, para enxaguar o conteúdo do cólon. Esta etapa permitiu a limpeza simultânea do cólon, usando uma tesoura foi aberto o cólon longitudinalmente, segurando com uma pinça foi colocado rapidamente sobre uma placa de prolipropeno preta, o cólon foi novamente limpo e aberto com um pincel contento formalina tamponada a 10%, colocado com o lado luminal voltado para cima. O lado luminal foi facilmente

identificado pelas variegações/cristas presentes na extremidade proximal do cólon. Após o cólon foi colocado sob microscópio estereoscópio (JVC-Victor Company of Japan Lda Ltda, Modelo TK –C720EC). Foi identificado qualquer crescimento tumoral ao longo do comprimento do cólon e registrado o número de pólipos.

4.9.1 Formalização e preparo dos segmentos de cólon

À medida que os segmentos de cólon suspeitos foram sendo removidos, eles foram colocados sobre a placa de prolipropeno preta e imediatamente, foram pincelados com solução de formalina tamponada a 10%.

À medida que foram enrijecendo, os fragmentos de tecido foram acondicionados em cassetes e colocados em frascos plásticos transparentes e individuais com tampas, contendo formalina tamponada a 10%, que foram identificados e guardados em caixas plásticas e ao abrigo de luz, para as análises histológicas.

4.10 Preparo das lâminas histológicas

Cada seguimento do cólon foi incluindo em bloco de parafina, em seguida foi cortado em micrótomo na espessura de 5µm, montado sobre lâmina de vidro coberta por lamínula e corado com Hematoxilina –Eosina, em seguida encaminhado ao patologista para análise histopatológica.

4.11 Análise histopatológica das lâminas

Os aspectos histopatológicos considerados para fins de análise estatísticas nesse estudo foram divididos em dois grupos: o grupo de lesões pré-neoplásicas/câncer e o grupo de lesões inflamatórias.

O grupo de lesões pré-neoplásicas/câncer contemplou 4 parâmetros histopatológicos :

1. Criptas aberrantes
2. Presença de adenoma
3. Displasia de baixo grau
4. Displasia de alto grau

O grupo de lesões inflamatórias contemplou 5 parâmetros histopatológicos:

1. Grau de inflamação
2. Ulceração de mucosa
3. Placa linfoide reacional
4. Atrofia de criptas
5. Dilatação de vasos linfáticos

4.12 Análise estatística

A avaliação da associação entre os grupos experimentais e as alterações histológicas, tanto de lesões pré- neoplásicas/câncer, como de sinais inflamatórios no cólon dos animais foi realizado por meio do teste do QUI-QUADRADO, com correção de BONFERRONI quando necessária.

Para a avaliação da massa corporal dos animais, e número de pólipos na região distal e pólipos totais foi realizado o teste Anova de uma via para variância com pós- teste de Tukey-Kramer, pois tiveram distribuição normal. O número de pólipos na região medial foi realizado teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunn, pois não tiveram distribuição normal.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS, versão 24.0, considerando um nível de significância de 5%.

Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatísticas descritivas ou na forma de tabela.

5 RESULTADOS

Após indução, alguns animais perderam desempenho em algumas sessões de treinamento de natação e na escada vertical.

Na semana 5 o animal 3 do grupo 2 apresentou edema na região anal, realizou o exercício normalmente sem perda de desempenho, o animal 6 do grupo 1 apresentou dificuldades no nado após realização do estímulo ao nado, sendo retirado aos 14:32 minutos do protocolo de natação que teria total de tempo 15 minutos. Os animais foram avaliados e retornaram a prática do exercício físico na próxima sessão.

Na semana 7o animal 6 do grupo 2, caiu da escada na oitava subida, foi avaliado e retornou ao exercício conseguindo completar a sessão de treinamento,

não houve perda de desempenho. O animal 6 do grupo1 morreu por causas não identificadas.

Animal 7 do grupo 1 não conseguiu completar a natação na semana 9, o animal foi avaliado e retornou a prática do exercício físico na próxima sessão, o animal 5 do grupo 5 morreu, por causas não identificadas, animal 3 do grupo 1 foi retirado da sessão de natação no minuto 13:14 do protocolo de natação que teria total de tempo 20 minutos de nado, o animal foi avaliado e retornou a prática do exercício físico na próxima sessão.

Animais 4 e 6 do grupo 4 caíram da escada na subida 6, na semana 12, foram examinados e retornaram ao exercício completando a sessão de treinamento.

5.1 Evolução da massa corporal dos grupos experimentais durante o experimento CCR associado a colite.

A tabela 1 mostra a evolução média da massa corporal dos grupos experimentais de animais em gramas do experimento CCR associado à colite até o dia da eutanásia. Semana 1 (inicial), semana 7 (metade do protocolo) semana 14 (final). O ganho de massa corporal foi significativamente apenas grupo 4.

Tabela1 – Evolução média de massa corporal dos grupos de animais (em gramas).

	Semana 1	Semana 7	Semana 14
	Média ± desvio padrão da média		
Grupo 1	37,00± 3,49	38,00± 3,07	38,85± 3,57
Grupo 2	35,5± 3,65	38,50± 3,77	39,50± 3,62
Grupo 3	34,50± 4,80	35,50± 5,23	36,50± 6,79
Grupo 4	34,00± 2,25	35,00± 1,69	36,50± 4,64
Grupo 5	36,50± 2,77	37,25± 2,71	40,42± 2,69

5.2 Avaliação dos animais durante os ciclos Dextran Sulfato de Sódio

Durante os três ciclos do DSS houve perda de massa corporal pouco significativa em alguns grupos como mostrado na tabela de forma descritiva. O grupo 1 no ciclo 1 e 2 não houve perda ou ganho de massa corporal, no ciclo 3 ocorreu uma média de perda de massa corporal de 0,3 gramas representando uma perda de 0,77%. No grupo 2 no ciclo 1 houve uma média de ganho de massa corporal 1,12 gramas representando um ganho de 3,1% , no ciclo 2 ocorreu uma média de perda de massa corporal de 0,5 gramas representando uma perda de 1,27%, no ciclo 3 ocorreu média de perda de massa corporal de 0,88 gramas representando uma média de perda massa corporal de 2,24%. No grupo 3 no ciclo 1 houve uma média de perda massa corporal de 0,25 gramas representando uma perda de massa corporal de 0,79%, no ciclo 2 ocorreu uma média de ganho de massa corporal de 3,86 gramas representando um ganho de 12%, no ciclo 3 ocorreu uma média de perda de massa corporal de 2,51 gramas representando uma perda de massa corporal de 7,01%. No grupo 4 no ciclo 1 houve uma média de ganho de massa corporal de 0,87 gramas representando um ganho de 2,57%, no ciclo 2 ocorreu uma média de perda de massa corporal 0,25 gramas representando uma perda de massa corporal de 0,69 %, no ciclo 3 ocorreu uma média de ganho de 0,13 gramas representando um ganho de massa corporal de 0,34%. No grupo 5 no ciclo 1 houve uma média de perda de massa corporal 0,25 gramas representando uma perda de massa corporal de 0,68%, no ciclo 2 ocorreu uma média de ganho de massa corporal 0,37 representando um ganho de massa corporal 0,99 %, no ciclo 3 uma média de perda de massa corporal de 0,12 gramas uma média de perda de massa corporal de 0,31%.

Tabela 2– Média da massa corporal dos grupos de animais durante os ciclos de dextra sulfato de sódio.

GRUPOS	CICLO 1		CICLO 2		CICLO 3	
	Média da massa corporal inicial	Média da massa corporal final	Média da massa corporal inicial	Média da massa corporal final	Média da massa corporal inicial	Média da massa corporal final
Grupo 1	37,75g	37,75g	38,125g	38,12g	38,66g	38,57g
Grupo 2	35,75g	36,87g	39,12g	38,62g	40,00g	39,12g
Grupo 3	31,62g	31,37g	32,00g	35,86g	35,76g	33,25g
Grupo 4	33,75g	34,62g	35,75g	35,50g	37,62g	37,75g
Grupo 5	36,5g	36,25g	37,25g	37,62g	37,87g	37,75g

g = gramas.

Durante os ciclos de DSS os animais foram examinados para avaliar o desenvolvimento da colite. Trabalhando um animal de cada vez, foi levantada a cauda para elevar as patas traseiras. Segurando o animal com uma mão para induzir o camundongo a defecar, com a outra mão foi segurado uma espátula e coletado todo o material fecal que o animal produziu, e avaliado a consistência das fezes ao final do período dos ciclos. No ciclo 1 dois animais do grupo 2 apresentaram diarreia e um sangramento visível, os demais animais dos outros grupos apresentaram fezes moles, sem sangramento oculto o visível. No ciclo 2, dois animais do grupo 1 e quatro animais do grupo 2 apresentaram fezes normais. Um animal do grupo 1 apresentou diarreia, os demais animais apresentaram fezes moles. Seis animais do grupo 1, três animais do grupo 2, oito animais do grupo 3, quatro animais do grupo 4 e oito animais do grupo 5 apresentaram sangramento oculto. No ciclo 3, todos animais de ambos os grupos apresentaram fezes moles. Todos animais do grupo 1 e 5, e dois animais do grupo 2 apresentaram sangramento oculto, os demais animais dos outros grupos não apresentaram sangramento oculto ou visível.

Tabela 3- Avaliação dos animais durante os ciclos de DSS.

Grupos	CICLO 1					CICLO 2					CICLO 3				
	Consistência das fezes			Sangramento		Consistência das fezes			Sangramento		Consistência das fezes			Sangramento	
	Normal	Mole	Diarreia	Oculto	Visível	Normal	Mole	Diarreia	Oculto	Visível	Normal	Mole	Diarreia	Oculto	Visível
Grupo 1	0	8	0	0	0	2	5	1	6	0	0	7	0	7	0
Grupo 2	0	6	2	0	1	4	4	0	3	0	0	8	0	2	0
Grupo 3	0	8	0	0	0	0	8	0	8	0	0	8	0	0	0
Grupo 4	0	8	0	0	0	0	8	0	4	0	0	8	0	0	0
Grupo 5	0	8	0	0	0	0	8	0	8	0	0	8	0	8	0

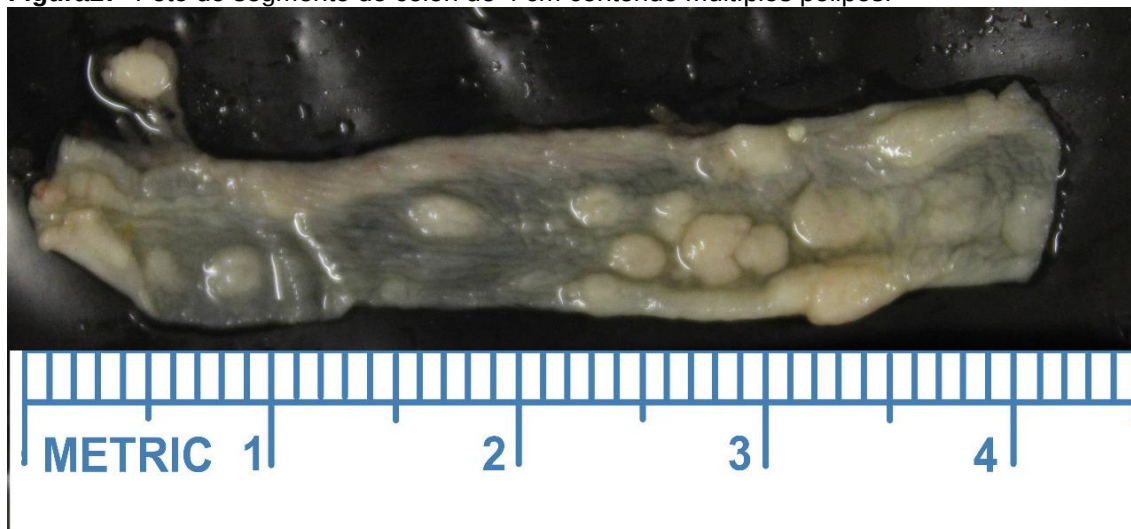
5.3 Desenvolvimentos de pólipos

Na tabela 5 estão apresentados os resultados do número de pólipos na região distal e medial de acordo com os grupos experimentais, o resultado foi significativo na região distal ($p=0,003$), medial ($p=0,04$) e número de pólipos totais de pólipos ($p=0,002$). Houve diferença significativa em comparação entre grupos experimentais e número de pólipos distal, os grupos 2,3 e 4 foi significativamente menor ao grupo 1 ($p < 0,5$), o grupo 2 e 4 foi significativamente menor ao grupo 5 ($p < 0,05$), grupo 1 comparado ao grupo 5 não houve diferença significativa. Na região medial, em comparação entre grupos experimentais o número de pólipos foi significativamente menor no grupo 4 em comparação ao grupo 5. No número totais de pólipos foi significativamente menor nos grupos 2,3 e 4 comparados ao grupo 1 ($p < 0,05$), e também diferença significativamente menor entre o grupo 2,3 e 4 comparados ao grupo 5 ($p < 0,05$), grupo 1 comparado ao grupo 5 não houve diferença significativa.

Tabela 4- Resultados de número de pólipos em relação entre grupos de exercício físico e sedentário.

Número de pólipos	GRUPOS					Valor de p
	G1	G2	G3	G4	G5	
	Pré e pós indução ex. aeróbico (n= 7)	Pré e pós indução ex. resistido (n= 8)	Pós indução ex. aeróbico (n= 8)	Pós indução ex. resistido (n= 8)	Sedentários (n= 7)	
Região distal	6,14± 1,57ab	3,12± 1,12c	3,75± 1,48bc	3,62± 1,50c	5,85± 1,34a	p=0,0003
Região medial	2,28± 1,25ab	1,62± 0,74ab	1,87± 1,12ab	0,87± 0,83b	2,42± 0,97a	p=0,04
Pólipos totais	8,28± 2,21a	4,87± 1,03b	5,62± 1,66b	4,5± 1,77b	7,71± 2,07a	p=0,002

Os dados são informados como média ± desvio padrão da média. Valor de p apresentado no número de pólipos região distal, teste de Anova pos test Tukey. Valor de p apresentado no número de pólipos região medial Valor de p no teste de Kruskal-Wallis pos test Dunn. Valor de p apresentado no número de pólipos totais, teste de Anova pós test Tukey. Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,5$).

Figura17- Foto do segmento do cólon de 4 cm contendo múltiplos pólipos.

5.4 Análise histológica

Na tabela 6 estão apresentados os resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios, em cada um dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Não houve associação significativa entre os grupos experimentais e as lesões pré-neoplásicas/câncer do tipo a) criptas aberrantes (teste qui-quadrado, $p=0,905$), b) adenomas ($p=0,404$), c) displasia de baixo grau ($p=0,232$) e d) displasia de alto grau (análise não possível).

Por outro lado, quanto aos sinais inflamatórios, houve associação significativa entre os grupos experimentais e a presença de ulceração mucosa nos cólons dos animais (teste do qui-quadrado $p=0,016$), sendo que o percentual de animais que apresentou estas ulcerações no grupo 3 (100,0% - $n=8$) foi significativamente maior do que aqueles animais do grupo 1 (28,0 %- $n=7$) teste do qui-quadrado, com correção de Bonferroni, $p<0,05$). No entanto, não houve associação significativa entre o grupo experimental e os sinais inflamatórios, do tipo a) grau de inflamação leve (não possível análise), b) placa linfoide reacional ($p= 0,612$), c) atrofia de criptas ($p= 0,176$), d) dilatação de vasos linfáticos ($p=0, 876$).

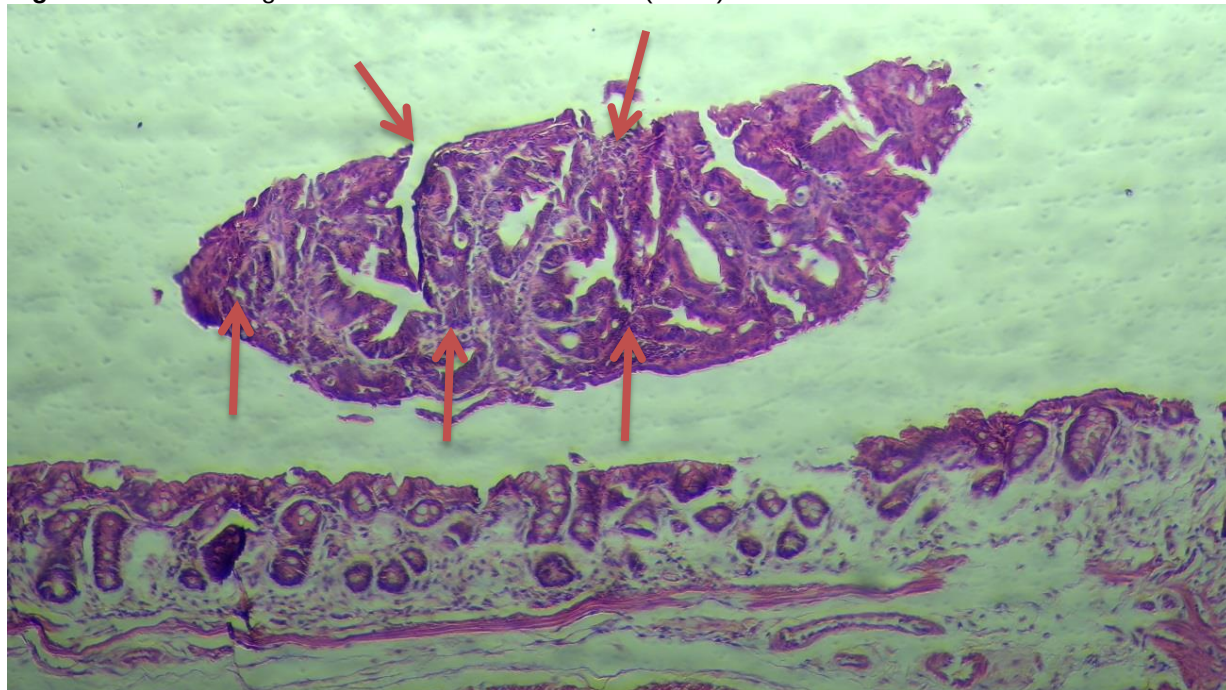
Tabela 5- Resultados das alterações histológicas, tanto de lesões pré-neoplásicas/câncer como de sinais inflamatórios, em cada um dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Alterações histopatológicas	G1 (n=7)	G2 (n=8)	G3 (n=8)	G4 (n=8)	G5 (n=7)	Valor de p
Lesões pré – neoplásicas/câncer						
Criptas aberrantes	85,7% (6)	75,0% (6)	87,5% (7)	87,5% (7)	100% (7)	0,905
Adenomas	85,7% (6)	62,5% (5)	75,0%(6)	87,5% (7)	100% (7)	0,404
Displasia de baixo grau	85,7%(6)	75,0 %(6)	100% (8)	100%(8)	100% (7)	0,232
Displasia de alto grau	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Sinais Inflamatórios						
Discreto grau de inflamação leve	100,0% (7)	100,0% (8)	100% (8)	100% (8)	100% (7)	-
Ulceração mucosa	28, 57% (2)b	37,5% (3)ab	100% (8)a	62,5% (5)ab	85,7% (6)ab	0,016
Placa linfoide reacional	85,7% (6)	87,5% (7)	100% (8)	87,5% (7)	85,7% (6)	0,612
Atrofia de criptas	71,4% (5)	87,5% (7)	100% (8)	100% (8)	100% (7)	0,176
Dilatação de vasos linfáticos	85,7% (6)	87,5% (7)	100% (8)	87,5% (7)	85,7% (6)	0,872

Os resultados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta). Valor de “p” no teste do qui- quadrado. Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (teste qui-quadrado, com correção de Bonferroni).

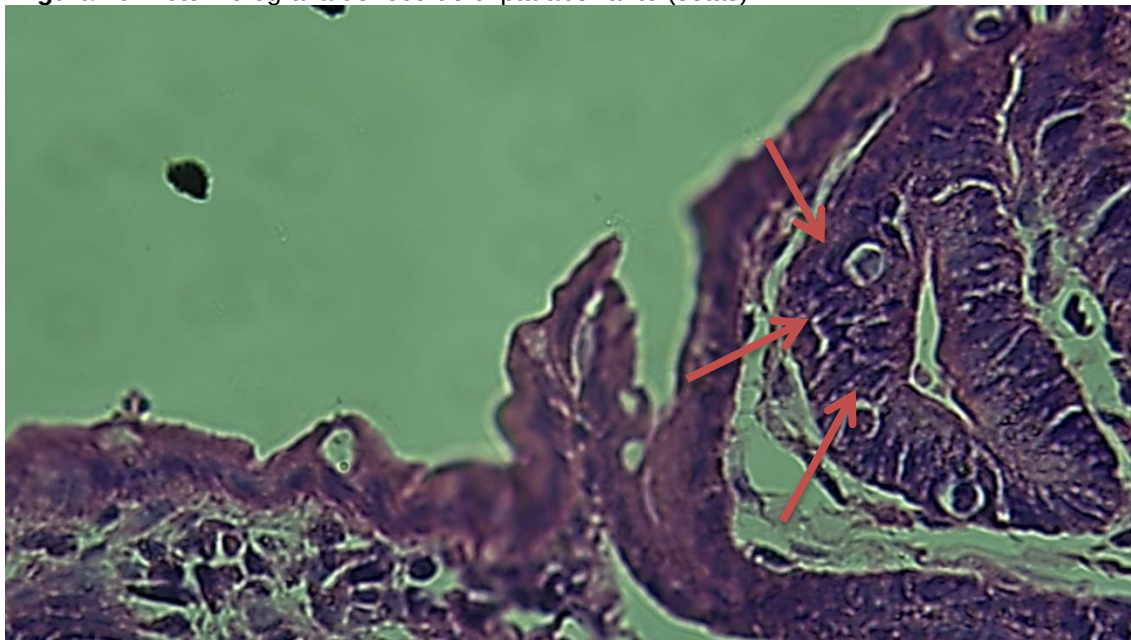
Na figura 18 observamos um adenoma tubular na mucosa colônica do animal 3 do grupo 5. Essa lesão é caracterizada por apresentar estruturas tubuliformes com projeção polipóide acima do plano da mucosa.

Figura 18- Fotomicrografia de um adenoma de cólon (setas).



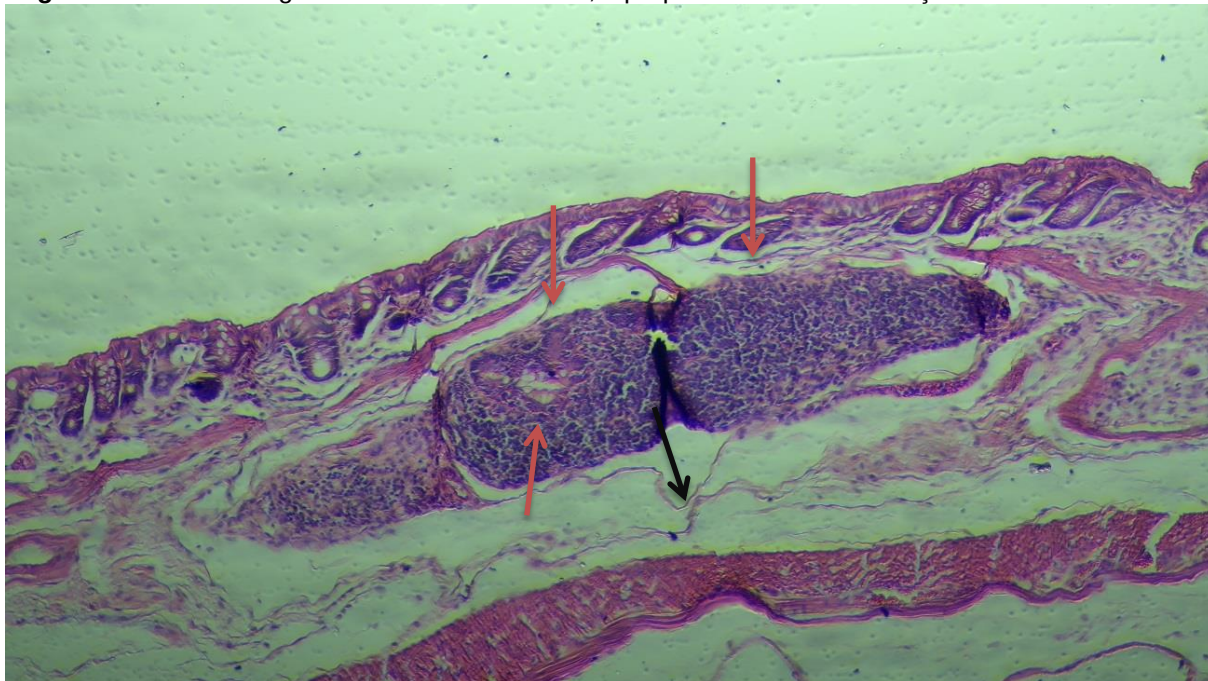
Na figura 19 observamos cripta aberrante alongadas com células cilíndricas, núcleos fusiformes/ovais.

.Figura 19- Fotomicrografia de foco de cripta aberrante (setas).



Na figura 20, observamos uma placa linfoide (setas vermelhas) e na submucosa, a presença de vaso linfáticos de lúmen dilatado (seta preta).

Figura 20– Fotocriomigrafia da mucosa colônica, hiperplasia linfoide e dilatação de vasos linfáticos.



6 DISCUSSÃO

Os estudos que têm mostrado que o exercício físico reduz a multiplicidade de câncer colorretal. Entretanto, alguns estudos experimentais têm sido realizados em modelos animais e poucos exploram os mecanismos de proteção contra o CCR.

A compreensão dos benefícios do exercício físico regular sobre o câncer colorretal é complexa pois os resultados benéficos podem ser afetados pelo tipo de atividade, duração, intensidade (PEDERSEN, 2009).

O exercício aeróbico e resistido pode ativar vias moleculares distintas devido às diferentes frequências e cargas mecânicas impostas ao músculo (NEVES; GONÇALVES; RAMALHO, 2020). O exercício físico em diferentes intensidades e duração resulta em diferentes adaptações metabólicas, levando ao aumento da massa mitocondrial, fornecimento de oxigênio, captação de glicose e capacidade antioxidante (BALLARÒ *et al.*, 2019). O exercício físico ocasiona diversos efeitos fisiológicos que podem ser classificados como agudos imediatos, agudos tardios e crônicos em diferentes intensidades e modalidades (ROGATTO, 2020).

Estudo de Lunz *et al.*, (2008) mostrou que intensidade diferente de exercício de natação não diminuiu o desenvolvimento do câncer colorretal comparado ao grupo controle, apenas a intensidade de 2% protegeu contra as lesões pré-neoplásicas do cólon induzidas por DMH, mas não contra o desenvolvimento de tumor, esse resultado tem uma semelhança com nossos resultados encontrados, onde o grupo 1 (natação por 14 semanas) teve um número maior de pólipos comparado aos grupos 2 e 4 (escada vertical por 14 e 7 semanas) e grupo 3 (natação por 7 semanas), este resultado mostra que a intensidade e duração do exercício desempenha um papel fundamental nesse processo.

Demarzo e Garcia, (2004) mostraram que uma única sessão de exercício exaustivo foi associada a um número aumentado de cripta aberrante colônico em ratos não treinados tratados com DMH, quando comparados aos animais do grupo controle. Esse estudo sugere que a duração da natação do grupo 1 (natação pré e pós indução, 14 semanas) pode ter sido exaustivo levando ao aumento ao número de pólipos.

Exercícios exaustivos de natação dão origem a danos nos tecidos, independentemente do estado treinado, por níveis aumentados de peroxidação

lipídica muscular e perda de integridade de mitocôndrias e espécies reativas encontrados em ratos exaustos treinados e não treinados (FERRARESSO, 2010).

O exercício físico exaustivo pode levar a um estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio(ERO) e uma defesa antioxidante inadequada. Essa condição adversa pode levar a danos celulares e teciduais nos componentes e está envolvida em diferentes estados fisiopatológicos, incluindo envelhecimento, exercício, doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas e câncer (PINGITORE *et al.*, 2015).

Reddy, Sugie e Lowenfels (1988), também mostraram em seu estudo que os animais exercitados em roda voluntária quando comparado aos animais sedentários, a incidência e multiplicidade de adenocarcinomas do cólon induzido por AOM foram significativamente inibidos, mas a incidência e multiplicidade de adenomas do cólon não foram afetados pelo exercício. Resultados encontrados foram semelhantes ao nosso resultado, onde os grupos de animais exercitados comparado ao grupo sedentário, houve diferença significativa na multiplicidade de adenomas.

Enquanto no estudo Colbert *et al.*,(2000), o treinamento aeróbico reduziu o número de lesões displásicas do cólon em 36% comparado ao do grupo sedentário exposto a agentes cancerígenos, em nosso estudo não houve diferença significativas entre os grupos exercitados e sedentário na incidência de lesões neoplásicas.

O estudo de KELLY *et al.*, (2017) o exercício voluntário antes ou durante o tratamento de AOM resultou em uma redução significativa no número de pólipos, mas o exercício após a exposição ao AOM não teve efeito. Entretanto nosso resultado o grupos 3 (natação pós indução, 7 semanas) e 4 (escada vertical pós indução, 7 semanas) teve um número de pólipos totais significativamente menor comparado ao grupo 1 (natação pré e pós indução) e grupo 5 (sedentário).

Estudo de Matsuo *et al.*, (2017) demonstrou que o natação intermitente de alta intensidade reduziu o número de criptas aberrantes induzido por DMH no cólon de rato, sugerindo que o treinamento físico de alta intensidade pode ter um efeito preventivo no câncer de cólon. O Estudo de Fuku *et al.*, (2007) mostrou que o treinamento de corrida de baixa intensidade inibe a iniciação do desenvolvimento de focos de criptas aberrantes do cólon induzida por DMH. Esses resultados mostram que diferentes exercícios físicos e intensidades podem gerar repostas diferente em lesões neoplásicas. Em nosso estudo não houve diferença significativa entre os

grupos experimentais em lesões neoplásicas, apenas no desenvolvimento de pólipos. Nossos resultados sugerem que a intensidade do exercício desempenha um papel fundamental nesse processo.

A inflamação crônica está ligada ao desenvolvimento de vários cânceres, incluindo os do cólon. A inflamação no intestino induz mutagênese carcinogênica e promove o início do câncer colorretal (Chen; Pitmon; Wang, 2017). Ambiente inflamatório tem muitas semelhanças com o microambiente tumoral, sugerindo a implicação dos mesmos mediadores na inflamação intestinal crônica e na carcinogênese colorretal. Muitos mediadores inflamatórios foram encontrados positivamente associados à prevalência de adenomas colorretais (Lucas; Barnich; Nguyen, 2017).

O câncer colorretal associado à colite surge como resultado da inflamação crônica no intestino e é responsável por desenvolvimento mais rápido do CCR. Os tumores associados à colite estão situados dentro do cólon nas áreas de inflamação ativa e se desenvolvem de forma semelhante ao CCR por meio do acúmulo de numerosas mutações nas células epiteliais intestinais (STASTNA *et al.*, 2019). Nosso resultado encontrado nos sinais inflamatórios do tecido de cólon houve diferença significativa na ulceração mucosa entre o grupo (natação pré e pós indução) e grupo 3(natação pós indução). A úlcera é uma lesão que ocorre na mucosa do trato gastrointestinal, sendo caracterizada por fatores agressores como a inflamação intestinal (VOMERO; COLPO, 2017).

Estudo de QIN *et al.*, (2017), foi induziudo colite crônica por DSS em ratos, e submetidos a um programa de natação de 7 semanas, 90 minutos por dia, 5 dias por semana. A natação inibiu a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias neutrófilos e TNF- α e IFN- γ , e diminuiu a expressão proteica do fator nuclear fosforilado-B, p65 e da ciclooxigenase 2, enquanto elevou os níveis de IL-10.

Inflamação crônica é considerada um dos principais mecanismos de promoção e aceleração do desenvolvimento do câncer. Esse processo envolve principalmente a atividade contínua de várias citocinas, quimiocinas (HOFMANOVA *et al.*, 2014). O músculo esquelético pode funcionar como um órgão endócrino devido à sua produção de hormônios do crescimento e citocinas conhecidas como miocinas, que são induzidas por um estímulo ao exercício (CAVALCANTE *et al.*, 2017).

Em modelos de camundongos com câncer, a incidência e proliferação de células cancerosas diminuíram em 60% devido ao movimento voluntário da roda, e o sistema imunológico dos camundongos está pronto para responder após 4 semanas de pré-treinamento antes da inoculação do tumor, portanto, parte do efeito do exercício pode matar as células cancerosas no local do câncer transplantado (WESTERLIND, 2002). O exercício pode regular a secreção do fator de crescimento da insulina, alvejar as passagens de Akt e mTOR, regular a atividade de IL-6 do músculo esquelético e melhorar a função mitocondrial, todos os quais podem inibir a proliferação de células cancerosas e induzir a apoptose (WANG; ZHOU, 2020).

A inibição da proliferação de células cancerosas, a indução da apoptose, a regulação do metabolismo do câncer e a regulação do ambiente imunológico são os principais mecanismos pelos quais o exercício físico pode produzir benefícios na prevenção e no tratamento do câncer (WANG; ZHOU, 2020).

O modelo de indução tumoral colorretal utilizado em nosso estudo é parcialmente parecido com estudos encontrado na literatura, nenhum estudo encontrado usou o DSS como parte da indução tumoral, a utilização de AOM em diferentes doses, exercício físico em diferente praticas, intensidades e duração podem gerar resultados diferentes. No entanto, os mecanismos subjacentes à proteção induzida pelo exercício físico contra lesões pré-neoplásicas ainda não estão claros.

Não conseguimos afirmar com exatidão qual o motivo da eficácia do exercício físico resistido influenciou na multiplicidade pólipos.

Portanto, mais estudos serão necessários para melhorar e elucidar os mecanismos que o exercício físico pode alterar no desenvolvimento do câncer colorretal.

7 CONCLUSÃO

O modelo de indução química Azoximetano (AOM) e Dextran Sulfato de Sódio (DSS) foi eficaz em promover a indução de lesões pré- neoplásicas nas células da mucosa colônica.

Os grupos experimentais de exercícios físicos não foi capaz de reduzir e nem de aumentar a incidência de lesões pré-neoplásicas. As alterações macroscópicas encontradas nos animais dos grupos exercitados e sedentário podem ser descritas como lesões discretamente elevadas na mucosa, geralmente arredondadas, com bordas bem definidas e de coloração um pouco mais pálidas que a mucosa colônica adjacente, em todos os grupos experimentais foram detectados adenomas exofíticos.

O exercício físico resistido diminuiu significativamente o número de pólipos na região distal no grupo 2 (exercício pré e pós indução resistido) e grupo 4 (pós indução resistido) comparado ao grupo 1 (natação pré e pós indução) e grupo 5 (sedentário). Na região medial houve apenas diferença significativa entre o grupo 4 (pós indução resistido) e grupo 5 (sedentário). No número total de pólipos houve diferença significativa menor no número de pólipos nos grupos 2(exercício pré e pós indução resistido),3 (pós indução natação) e 4(pós indução resistido) comparados ao grupo 1(natação pré e pós indução) e nos grupos 2,3 e 4 comparados ao grupo 5(sedentário).

Portanto o exercício físico resistido foi capaz de reduzir o número de pólipos tanto pré e pós indução no exercício resistido, o exercício de resistência aeróbica foi capaz de reduzir o número de pólipos apenas pós indução comparado ao grupo sedentário.

8 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C. *et al.* A murine experimental models in carcinogenesis studies are efficient?. **International Journal for Innovation Education and Research**, v. 8, n. 1, p. 213–219, 2020
- ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio, C; OLIVEIRA, Rosilene, S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, 2006.
- AOI, Wataru. *et al.* Unraveling the Function of Skeletal Muscle as a Secretory Organ. **NUTRITION AND ENHANCED SPORTS PERFORMANCE**, p. 305, 2013.
- AOKI, Koji; TAKETO, Makoto, M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. **Journal of cell science**, v. 120, n. 19, p. 3327-3335, 2007.
- ARAUJO, Adriana Ladeira de. **Efeito do exercício físico regular e intenso no sistema imune de idosos**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ARIDA, Ricardo, M. *et al.* Paradigmas de exercícios para estudar a recuperação de lesões cerebrais em roedores. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 2011, 90.6: 452-465.
- AUGUSTO, SOBRINHO, C. *et al.* Perspectives of the use of sulforaphane in animal model of colorectal carcinogenesis in brazil: a review. **International Journal for Innovation Education and Research**, v. 7, n. 12, p. 421–427, 2019.
- AVELINO, Andre Nunes. Ações antioxidante e antígeno-tóxica da goma arábica na mucosa intestinal, fígado, medula óssea e sangue de camundongos swiss submetidos à carcinogênese colorretal pelo azoximetano. 2020.
- BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **The lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.
- BALLARÒ, Riccardo. *et al.* Moderate exercise improves experimental cancer cachexia by modulating the redox homeostasis. *Cancers*, v. 11, n. 3, p. 285, 2019.
- BARBOSA, Daniel, F; LIMA, Carleuza, F. Efeitos do exercício físico em comportamentos relacionados com a ansiedade em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 2, p. 122-125, 2016.
- BAVARESCO, Anelise. *et al.* Efeitos da atividade física voluntária sobre a neuroinflamação induzida por LPS. 2015.
- BERGSTROM, Kirk. *et al.* Defective intestinal mucin-type O-glycosylation causes spontaneous colitis-associated cancer in mice. **Gastroenterology**, v. 151, n. 1, p. 152-164. e11, 2016.

BERNARDO, T, C. *et al.* Physical Exercise and Brain Mitochondrial Fitness: The Possible Role Against A Alzheimer's Disease. **Brain Pathology**, v. 26, n. 5, p. 648-663, 2016.

BIEN, Stephanie,A. *et al.* Genetic variant predictors of gene expression provide new insight into risk of colorectal cancer. **Human genetics**, v. 138, n. 4, p. 307-326, 2019.

BOATENG, J. *et al.* Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 725-732, 2007.

BOLAND,Richard; GOEL, Ajay. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073-2087. e3, 2010.

BOLHAQUEIRO, Ana ,C,F. *et al.* Ongoing chromosomal instability and karyotype evolution in human colorectal cancer organoids. **Nature genetics**, v. 51, n. 5, p. 824-834, 2019.

BOUHY, Delphine. *et al.* A knock-in/knock-out mouse model of HSPB8-associated distal hereditary motor neuropathy and myopathy reveals toxic gain-of-function of mutant Hspb8. **Acta neuropathologica**, v. 135, n. 1, p. 131-148, 2018.

BOUTIN, Adam, T. *et al.* Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. **Genes & development**, v. 31, n. 4, p. 370-382, 2017.

BRAHÃO JUNIOR, Virgilio; AMADEU, Marco Antonio; PEZUK, Julia Alejandra. CONCEITO, DEFINIÇÃO E DIFERENÇA-PRÁTICA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS, ATIVIDADE FÍSICA E ESPORTE. 2019.

BÜRTIN, Florian; MULLINS, Christina S; LINNEBACHER, Michael. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 13, p. 1394, 2020.

CAMPBELL, John, P.; TURNER, James E. Debunking the myth of exercise-induced immune suppression: redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 648, 2018.

CARETHERS, John, M; JUNG, Barbara H. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1177-1190. e3, 2015.

CAVALCANTE, Paula, A, M. *et al.* Aerobic but not resistance exercise can induce inflammatory pathways via toll-like 2 and 4: a systematic review. **Sports medicine-open**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2017.

CHAMARI, Karim; PADULO, Johnny. 'Aerobic'and 'Anaerobic'terms used in exercise physiology: a critical terminology reflection. **Sports medicine-open**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2015.

CHAN, Carlos HF; COOK, Denise; STANNERS, Clifford P. Increased colon tumor susceptibility in azoxymethane treated CEABAC transgenic mice. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 9, p. 1909-1916, 2006.

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

CHEN, Ju; PITMON, Elise; WANG, Kepeng. Microbiome, inflammation and colorectal cancer. In: **Seminars in Immunology**. Academic Press, 2017. p. 43-53.

COLBERT, LISA H. *et al.* Exercise and tumor development in a mouse predisposed to multiple intestinal adenomas. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 10, p. 1704-1708, 2000.

CONTARTEZE, Ricardo, V, L. *et al.* Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 415-422, 2008.

COOK, Marc D. *et al.* Forced treadmill exercise training exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis. **Brain, behavior, and immunity**, v. 33, p. 46-56, 2013.

CORREIA, Joana. *et al.* Instabilidade cromossômica e imunodeficiência: associação essencial no diagnóstico de Síndrome de Nijmegen. **Nascer e Crescer**, Porto, v. 26, n. 2, p. 133-137, jun. 2017.

DA SILVA, Lucas, F, B, P. *et al.* Análise morfológica dos processos patológicos gerais em ratos obesos e sua relação com o exercício físico. In: **Colloquium Vitae**. ISSN: 1984-6436. 2020. p. 93-98.

DAS, Vishal; KALITA, Jatin; PAL, Mintu. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 8-19, 2017.

DASH, Chandravanu. Drugs Targeting Epigenetic Modifications and Plausible Therapeutic Strategies Against Colorectal Cancer. **Epigenetic Approaches in Drug Discovery, Development and Treatment**, 2020.

DE ROBERTIS, Mariangela. *et al.* The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. **Journal of carcinogenesis**, v. 10, 2011.

DE ROSA, Marina. *et al.* Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer. **Oncology reports**, v. 34, n. 3, p. 1087-1096, 2015.

DEMARZO, Marcelo Marcos Piva; GARCIA, Sérgio Britto. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. **Cancer letters**, v. 216, n. 1, p. 31-34, 2004.

DENARDO, David G.; COUSSENS, Lisa M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 212, 2007.

DE-SOUZA, Alana Serrano Campelo; COSTA-CASAGRANDE, Thais Andrade. MODELOS ANIMAIS DE CARCINOGENESE COLORRETAL. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, São Paulo , v. 31, n. 2, e1369, 2018

DIETMAIER,W.; BÜTTNER, R.; RÜSCHOFF, J. Mikrosatelliteninstabilität. Der Pathologe, v. 40, n. 3, p. 313-327, 2019.

DOYLE, Alfred. *et al.* The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. **Transgenic research**, v. 21, n. 2, p. 327-349, 2012.

DRAKE, Joshua C.; WILSON, Rebecca J.; YAN, Zhen. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 13-22, 2016.

DROST, Jarno. *et al.* Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 43-47, 2015.

ESTIMATIVA, I. N. C. A. Incidência de Câncer no Brasil. 2014. **Rio de Janeiro: INCA, 124p**, 2014.

FAN, Weiwei. *et al.* PPAR δ promotes running endurance by preserving glucose. **Cell metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1186-1193. e4, 2017.

FEARON, Eric R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 479-507, 2011.

FERIOLI, Martina. *et al.* Role of physical exercise in the regulation of epigenetic mechanisms in inflammation, cancer, neurodegenerative diseases, and aging process. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 9, p. 14852-14864, 2019.

FERRARESSO, Rodrigo, Luiz, P. Estudo da relação entre ataque oxidativo, sistema de defesa antioxidante e atividade mitocondrial em ratos submetidos a um protocolo de indução ao overtraining em esteira. 2010. 84 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

FREITAS, Juliana, S. *et al.* Efeitos do treinamento prévio em natação sobre a carcinogênese experimental do cólon em ratos Wistar. 2011.

FRODERMANN, Vanessa. *et al.* Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. **Nature medicine**, v. 25, n. 11, p. 1761-1771, 2019.

FUJIWARA, Kyoko. *et al.* Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 8, p. 1495-1505, 2004.

GELSOMINO, Fabio. *et al.* The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: a review. **Cancer treatment reviews**, v. 51, p. 19-26, 2016.

GIAN, Luigi de'Angelis. *et al.* Microsatellite instability in colorectal cancer. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 89, n. Suppl 9, p. 97, 2018.

GOBATTO, Claudio Alexandre. *et al.* Avaliações fisiológicas adaptadas a roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, 2008.

GUEDES, Janesca Mansur. *et al.* Exercícios físicos de resistência, hipertrofia e força muscular reduzem igualmente adiposidade, inflamação e resistência à insulina em camundongos obesos por dieta hiperlipídica. **Einstein (São Paulo)**, v. 18, 2020.

HAGLAND, Hanne R. *et al.* Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. **Digestive surgery**, v. 30, n. 1, p. 12-25, 2013.

HAIGIS, Kevin M. *et al.* Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. **Nature genetics**, v. 40, n. 5, p. 600, 2008.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert, A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARALDSDOTTIR, Sigurdis. *et al.* Colorectal cancer-review. **Laeknabladid**, v. 100, n. 2, p. 75-82, 2014.

HARRISS, David, J. *et al.* Physical activity before and after diagnosis of colorectal cancer. **Sports medicine**, v. 37, n. 11, p. 947-960, 2007.

HOFFMAN, Robert, M. Modelos ortotópicos de camundongos metastáticos para descoberta e avaliação de drogas anticâncer: uma ponte para a clínica. **Novos medicamentos em investigação**, v. 17, n. 4, pág. 343-360, 1999.

HOFMANOVÁ, Jiřina. *et al.* Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

HUANG, Dongdong. *et al.* Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 1, p. 173-187, 2018.

HUWE, Fabrine, G. *et al.* Avaliação das características clínicas e epidemiológicas e sobrevida global de pacientes portadores de câncer colorretal. **Rev Epidemiol Controle Infecç**, v. 3, n. 4, p. 112-6, 2014.

IEMITSU, Motoyuki. *et al.* Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. **American Journal of**

Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 286, n. 5, p. H1696-H1705, 2004.

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

JAFRI, Mohammad A. *et al.* Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 69, 2016.

JOISTEN, Niklas. *et al.* Influence of different rehabilitative aerobic exercise programs on (anti-) inflammatory immune signalling, cognitive and functional capacity in persons with MS—study protocol of a randomized controlled trial. **BMC neurology**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

KAWAGUCHI, Yoshikuni. *et al.* Mutation status of RAS, TP53, and SMAD4 is superior to mutation status of RAS alone for predicting prognosis after resection of colorectal liver metastases. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 19, p. 5843-5851, 2019.

KELLY, Scott A. *et al.* Prevention of tumorigenesis in mice by exercise is dependent on strain background and timing relative to carcinogen exposure. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

KHOT, Maithilee. *et al.* Twist1 induces chromosomal instability (CIN) in colorectal cancer cells. **Human Molecular Genetics**, 2020.

KIM, Janice J. *et al.* Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 60, p. e3678, 2012.

KUDRYAVTSEVA, Anna V. *et al.* Important molecular genetic markers of colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 33, p. 53959, 2016.

KUIPERS EJ, GRADY, W,M; LIEBERMAN D. *et al.* Colorectal cancer. **Nat Rev Dis Primers**. 2015

LASSANCE, Fábila, A, C. *et al.* Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 1, n. 1, 2012.

LEANDRO, Carol Góis *et al.* Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, p. 343-348, 2007.

LEE, G. H. *et al.* Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer?—a systematic review. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 41, n. 3, p. 300-308, 2015.

LEYSTRA, Alyssa, A ; CLAPPER, Margie, L. A microbiota intestinal influencia os resultados experimentais em modelos de câncer colorretal em camundongos. **Genes**, v. 10, n. 11, pág. 900, 2019.

LIMA, Bruno Roque. Desenvolvimento de modelo de xenoenxerto ortotópico de metástase hepática de câncer colorretal em camundongo imunodeficiente .São Paulo, 2018.

LIU, Zhenzhen. *et al.* Extensive metabolic disorders are present in APC^{min} tumorigenesis mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 427, p. 57-64, 2016.

LIU, Weina. *et al.* Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. **Journal of affective disorders**, v. 227, p. 126-135, 2018.

LODISH, Harvey. *et al.* **Biologia celular e molecular**. Artmed Editora, 2014.

LOSSO, Grazielle, M. *et al.* Microsatellite instability-MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 25, n. 4, p. 240-244, 2012.

LUCAS, Cécily; BARNICH, Nicolas; NGUYEN, Hang, T, T. Microbiota, inflammation and colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1310, 2017.

LUNZ, Wellington; MOREIRA, Ana, P, B; VIANA, Elaine, C. Mecanismos de proteção contra o câncer colorretal pelo exercício e atividade física. **Revista Digital Efdeportes**, v. 11, p. 102, 2006.

MACHADO, Vanessa, F. *et al.* Experimental Model of Rectal Carcinogenesis Induced by N-Methyl-N-Nitrosoguanidine in Mice with Endoscopic Evaluation. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 16, p. 2505, 2020.

MARCHI-ALVES, Leila, M. *et al.* Leptina, hipertensão arterial e obesidade: importância das ações de enfermagem. **Acta paul. enferm.** São Paulo, v. 23, n. 2, p. 286-290, Apr. 2010.

MÁRMOL, Inés. *et al.* Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 197, 2017.

MARTINEZ, Carlos, A, R. *et al.* Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dano oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 2009.

MATSUO, Kaori. *et al.* A mechanism underlying preventive effect of high-intensity training on colon cancer. **Med. Sci. Sports Exerc**, v. 49, p. 1805-1816, 2017.

MELO, S. F. S. *et al.* Cardiovascular adaptations induced by resistance training in animal models. **International journal of medical sciences**, v. 15, n. 4, p. 403, 2018.

MENDES, Fernando; MARTINS, Diana. O impacto do exercício físico na inflamação, stress oxidativo e na remodelação do músculo cardíaco. **Journal of Brazilian Society of Cardiology**, v. 114, n. 1, p. 106-108, 2020.

MOGHETTI, Paolo. *et al.* Metabolic effects of exercise. In: **Sports Endocrinology**. Karger Publishers, 2016. p. 44-57.

MONTI, Elena. *et al.* Are muscle fibres of body builders intrinsically weaker? A comparison with single fibres of aged-matched controls. **Acta Physiologica**, p. e13557, 2020.

MOREIRA, Osvaldo, C. *et al.* Mitochondrial function and mitophagy in the elderly: effects of exercise. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

MOURA, Silmara, F. *et al.* Padrão sintomatológico em pacientes do câncer colorretal de acordo com a idade. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, 2020.

MÜLLER, Mike, F; IBRAHIM, Ashraf, E,K; ARENDS, Mark, J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. **Virchows Archiv**, v. 469, n. 2, p. 125-134, 2016.

NAKAGAMA, Hitoshi; NAKANISHI, Masako; OCHIAI, Masako. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. **Cancer science**, v. 96, n. 10, p. 627-636, 2005.

NARISAWA, Tomio. *et al.* Large bowel carcinogenesis in mice and rats by several intrarectal doses of methylnitrosourea and negative effect of nitrite plus methylurea. **Cancer Research**, v. 36, n. 2 Part 1, p. 505-510, 1976.

NEVES, M,B; GONÇALVES, A,F; RAMALHO, R,T. ação do exercício físico sobre o câncer cólon: revisão sistemática. **Fiep Bulletin**, v.90, n.1, 2020.

NIELSEN, B. *et al.* Muscle blood flow and muscle metabolism during exercise and heat stress. **Journal of applied physiology**, v. 69, n. 3, p. 1040-1046, 1990.

OCHIAI, Masako *et al.* Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 4, p. 1607-1614, 2003.

OGATA, Daniel Cury *et al.* Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da β -catenina e Ki-67. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 37, n. 2, p. 114-120, 2010.

OKUGAWA, Yoshinaga; GRADY, William M.; GOEL, Ajay. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1204-1225. e12, 2015.

PAN, Qingfei *et al.* Genomic variants in mouse model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate improperly mimic human colorectal cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

PANDURO CERDA, Arturo; LIMA G, G; VILLALOBOS, J. Genética molecular del cáncer colorectal y carcinogénesis. **Revista de investigacion clinica**, v. 45, n. 5, p. 493-504, 1993.

PAOLUCCI, Emily M. *et al.* Exercise reduces depression and inflammation but intensity matters. **Biological psychology**, v. 133, p. 79-84, 2018.

PARANG, Bobak; BARRETT, Caitlyn W.; WILLIAMS, Christopher S. AOM/DSS model of colitis-associated cancer. In: **Gastrointestinal Physiology and Diseases**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 297-307.

PARASCHIVA, Camila Contini; SILVA, Tamara Lopes; LIMA, Vanessa Vilas Boas. The role of physical exercise in the tumor necrosis factor alfa in ankylosing spondylitis carriers/O papel do Exercício Físico no fator de necrose tumoral alfa em portadores de espondilite anquilosante. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 3, n. 13, p. 45-55, 2009.

PAREJA-GALEANO, Helios; SANCHIS-GOMAR, Fabian; GARCÍA-GIMÉNEZ, José Luis. Exercício físico e modulação epigenética: elucidando mecanismos complexos. **Medicina esportiva**, v. 44, n. 4, p. 429-436, 2014

PATEL, Harsh *et al.* Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. **World journal of cardiology**, v. 9, n. 2, p. 134, 2017.

PATEL, Swati G.; AHNEN, Dennis J. Colorectal cancer in the young. **Current gastroenterology reports**, v. 20, n. 4, p. 15, 2018.

PEDERSEN, Bente K. The disease of physical inactivity—and the role of myokines in muscle–fat cross talk. *The Journal of physiology*, v. 587, n. 23, p. 5559-5568, 2009.

PEDERSEN, Bente Klarlund. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **European journal of clinical investigation**, v. 47, n. 8, p. 600-611, 2017.

PEDERSEN, Line; CHRISTENSEN, Jesper Frank; HOJMAN, Pernille. Effects of exercise on tumor physiology and metabolism. **The Cancer Journal**, v. 21, n. 2, p. 111-116, 2015.

PERINI, Renza *et al.* Acute effects of aerobic exercise promote learning. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

PERSE, M.; CERAR, Anton. Dimethylhydrazine model is not appropriate for evaluating effect of ethanol on colorectal cancer. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 99, n. 8, p. 463-466, 2007.

PERŠE, Martina; CERAR, Anton. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **BioMed Research International**, v. 2011, 2011.

PILLERON, Sophie *et al.* Cervical cancer burden in Latin America and the Caribbean: Where are we?. **International Journal of Cancer**, 2020.

PINGITORE, Alessandro *et al.* Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 916-922, 2015.

PINO, Maria S.; CHUNG, Daniel C. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 5, n. 3, p. 385-399, 2011.

PINTO, Graziela Hünning *et al.* Hipertrofia cardíaca fisiológica induzida por exercício voluntário e natação em camundongos balb/c. **Arquivos brasileiros de cardiologia. São Paulo**, 2015.

PRIOLLI, Denise Gonçalves *et al.* Proposta para estadiamento do câncer colorretal baseada em critérios morfofuncionais: correlação com níveis séricos do antígeno carcinoembrionário. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 374-383, 2007.

PRITCHARD, Colin C. *et al.* Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 375, p. 443-453, 2016.

QIN, Ling *et al.* Swimming attenuates inflammation, oxidative stress, and apoptosis in a rat model of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 7391, 2017.

RADAK, Zsolt *et al.* Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 10, p. 1208-1246, 2013.

RECIO- BOILES, Alejandro; WAHEED, Abdul; CAGIR, Burt. Cancer, colon. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019.

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

REIS, Bruno Luiz Fonseca Schamber. **Indução de mutações por ENU em camundongos e Mapeamento genético**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.

REN, Junze *et al.* The application of Apc Min/+ mouse model in colorectal tumor researches. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 145, n. 5, p. 1111-1122, 2019.

ROBINSON, Matthew M. *et al.* Enhanced protein translation underlies improved metabolic and physical adaptations to different exercise training modes in young and old humans. **Cell metabolism**, v. 25, n. 3, p. 581-592, 2017.

RODRIGUES, Marcella, D; BORIN, Sergio, H; SILVA, Carlos, A. Relações metabólicas em ratos sob o treinamento anaeróbio em escada. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 39, n. 1, p. 63-67, 2017.

ROGATTO, Gustavo Puggina. Perfil metabólico durante o exercício físico: influência da intensidade e da duração do esforço sobre a utilização de substratos energéticos. **Revista digital EFDEPORTES**, v. 54, 2002.

ROSENBERG, Daniel W.; GIARDINA, Charles; TANAKA, Takuji. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 183-196, 2009.
RUIZ-CASADO, Ana *et al.* Exercise and the hallmarks of cancer. **Trends in cancer**, v. 3, n. 6, p. 423-441, 2017.

SAFDAR, Adeel *et al.* Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 10, p. 4135-4140, 2011.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. "Intestino grosso"; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/intestino-grosso.htm>. Acesso em 16 de novembro de 2020.

SCOMAZZON, Sofia, P. Razão das citocinas pró/anti-inflamatórias e de eHSP70/iHSP70 de linfócitos de ratos como marcador de estado imunológico após diferentes intensidades de exercício. 2012.

SEO, Dae Yun *et al.* Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1673-1687, 2014.

SHAW, Alice T. *et al.* Evaluation of ceritinib-treated patients (pts) with anaplastic lymphoma kinase rearranged (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) and brain metastases in the ASCEND-1 study. **Annals of oncology**, v. 25, p. v.455, 2014.

SHAW, David M. *et al.* T-cells and their cytokine production: the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. **Cytokine**, v. 104, p. 136-142, 2018.

SILVA, Maicon F.; SIVIERI, Kátia; ROSSI, Elizeu A. Effects of a probiotic soy product and physical exercise on formation of pre-neoplastic lesions in rat colons in a short-term model of carcinogenic. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 17, 2009.

SIMPSON, Richard J. *et al.* Exercise and the regulation of immune functions. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2015. p. 355-380.

SIOLAS, Despina; HANNON, Gregory J. Xenoenxertos tumorais derivados de pacientes: transformando amostras clínicas em modelos de camundongos. **Pesquisa sobre câncer**, v. 73, n. 17, pág. 5315-5319, 2013.

SODRING, Marianne; GUNNES, Gjermund; PAULSEN, Jan Erik. Spontaneous initiation, promotion and progression of colorectal cancer in the novel A/JM in/+ mouse. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 8, p. 1936-1946, 2016.

SONG, Mingyang; CHAN, Andrew T. The potential role of exercise and nutrition in harnessing the immune system to improve colorectal cancer survival. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, p. 596-600, 2018.

STASTNA, Monika *et al.* Human Colorectal Cancer from the Perspective of Mouse Models. **Genes**, v. 10, n. 10, p. 788, 2019.

STOFFEL, Elena M. *et al.* Germline genetic features of young individuals with colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 154, n. 4, p. 897-905. e1, 2018.

STRAPAZZON, Giulia. Avaliação de parâmetros bioquímicos e genotóxicos em camundongos submetidos à dieta cafeteria e exercício físico voluntário. 2020.

STRICKLAND, Justin C.; SMITH, Mark A. Animal models of resistance exercise and their application to neuroscience research. **Journal of neuroscience methods**, v. 273, p. 191-200, 2016.

SUZUKI, Katsuhiko. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 223, 2019.

TAHA, Eman A. *et al.* Knockout of MMP3 weakens solid tumor organoids and cancer extracellular vesicles. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1260, 2020.

TESTA, Ugo; PELOSI, Elvira; CASTELLI, Germana. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 31, 2018.

THAKER, Ameet I. *et al.* Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 67, p. e4100, 2012.

THAN, B, L, N. *et al.* CFTR is a tumor suppressor gene in murine and human intestinal cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 32, p. 4191-4199, 2016.

THU, Vu Thi; KIM, Hyoung Kyu; HAN, Jin. Acute and chronic exercise in animal models. In: **Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment**. Springer, Singapore, 2017.

VAN DER HEIJDEN, Maartje *et al.* Spatiotemporal regulation of clonogenicity in colorectal cancer xenografts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 13, p. 6140-6145, 2019.

VENKATACHALAM, Karthikkumar *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology Research**, v. 9, n. 1, p. 2-18, 2020.

VERÍSSIMO, Manuel Teixeira *et al.* Efeito do exercício físico moderado no sistema imunológico dos idosos. **Geriatrics–Edição Portuguesa**, v. 2, n. 8, p. 69-76, 2006.

VESKOUKIS, Aristidis S., *et al.* A novel swimming performance test in rats. **Chinese Journal of Physiology**, v. 61, n.3, p.144-151. 2018.

VOLTARELLI, F, A; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M, A, R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 11, p. 1389-1394, 2002.

VOMERO, Nathália, D; COLPO, Elisângela. Cuidados nutricionais na úlcera péptica. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 27, n. 4, p. 298-302, 2014.

WANG, Qiaoyun; ZHOU, Wenli. Roles and molecular mechanisms of physical exercise in cancer prevention and treatment. **Journal of Sport and Health Science**, 2020.

WESTERLIND, K. C. *et al.* Effect of exercise on the rat mammary gland: implications for carcinogenesis. **Acta physiologica scandinavica**, v. 175, n. 2, p. 147-156, 2002.

WESTCOTT, Wayne, L. Resistance training is medicine: effects of strength training on health. **Current sports medicine reports**, v. 11, n. 4, p. 209-216, 2012.

XU, Changxin. *et al.* Deficiency of phospholipase A2 group 7 decreases intestinal polyposis and colon tumorigenesis in ApcMin/+ mice. **Cancer research**, v. 73, n. 9, p. 2806-2816, 2013.

ZHOU, Yingsong. *et al.* High-dose astaxanthin supplementation suppresses antioxidant enzyme activity during moderate-intensity swimming training in mice. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1244, 2019.

ZIMMER, P.; BLOCH, W. Physical exercise and epigenetic adaptations of the cardiovascular system. **Herz**, v. 40, n. 3, p. 353-360, 2015.

9 ANEXO

Anexo 1- Certificado Da Comissão De Ética No Uso De Animais CEUA da UFMS.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto do exercício físico no músculo esquelético de camundongos com câncer colo retal induzido por azoximetano (AOM)", registrada com o nº 1.091/2019, sob a responsabilidade de **Rondon Tosta Ramalho** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 8ª reunião ordinária do dia 31/10/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2019 a 01/03/2021
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus / hairless</i>
Nº de animais	50
Peso/Idade	20 a 30 gramas / 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	UT-Biotério/UFMS

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 02 de dezembro de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 02/12/2019, às 15:04, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1659401** e o código CRC **B5869C7E**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Anexo2- Artigo submetido: Effect Of Physical Exercise On Colorectal Cancer: Systematic Review. International Journal for Innovation Education and Research (IJER).

Marcelo Barbosa Neves (Corresponding author)

Fellow Master degree - Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

Email: marcelo_barbosa@ufms.br

<https://orcid.org/0000-0001-9285-2208>

Alessandra de Figueiredo Gonçalves

Fellow Master degree - Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

Gabriela Rodrigues Alves

Fellow Doctoral degree - Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

Luiz Carlos Takita

Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

Letícia Silva Fagundes

Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasilia, Brasilia-DF, Brazil.

Ana Keren dos Santos Rocha

Student Biomedicine Unigran Capital University Center, Campo Grande-MS, Brazil.

Udenilson Nunes da Silva Junior

Student Federal University of Mato Grosso do Sul Medicine - FAMED / UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

Julia Fogaça Toniello

Student Federal University of Mato Grosso do Sul Medicine - FAMED / UFMS, Campo Grande-MS, Brazil

Rondon Tosta Ramalho (Corresponding author)

Full Professor, Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

<https://orcid.org/0000-0002-6193-7521>

Email: rondontosta@gmail.com

EFFECT OF PHYSICAL EXERCISE ON COLORECTAL CANCER: SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT

Aerobic and resistance physical exercise can activate different molecular pathways due to different intensities, duration, and mechanical loads imposed on the muscles. The activity can result in metabolic adaptations, such as increased mitochondrial mass, oxygen supply, glucose uptake, and antioxidant capacity. The method of this systematic review followed recommendations proposed by the PRISMA Statement. Were included studies that used physical exercise as an intervention in rats and mice with induced colorectal cancer. The Studies' selection was on databases: Bireme, PubMed, Science Direct, Medline, Ibecs, Lilacs, Bdenf, Binacis, Scielo, and bibliographic references selected articles. Animal models researches showed that aerobic and resistance exercise could reduce several

risk factors like oxidating stress and the tumor's pro-inflammatory status. That happens due to cytokines' regulation, thereby improve organic's defenses and reduce colon inflammation.

Keywords: Colorectal cancer; Physical exercise; Mice and Rats.

1. INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO, 2018), cancer is one of the leading causes of death globally, causing 9.6 million deaths in 2018, with colorectal cancer () responsible for 1.8 million cases. This form of cancer develops sporadically, in inherited cancer syndromes cases, or based on inflammatory bowel diseases. (Weitz *et al.*, 2005).

Although anyone can develop colorectal cancer, several factors are associated with an increased risk for a disease. Some risk factors are modifiable like diet, obesity, lack of physical activity, tobacco use, and moderate to heavy alcohol use. (Rudy and Zdon, 2000). Colon tumors usually develop through a multiple-stage process that involves histological, morphological, and genetic changes, which accumulate over time. (Koelwyn, Wennerberg, Demaria & Jones, 2015).

Tumor progression is regulated by complex and multifaceted interactions between systemic environment (host), tumor microenvironment, and cancer cells. Whether in primary or distant ectopic sites, the tumor microenvironment is affected by increased growth factors in circulation, cytokines, angiogenic factors, hormones, and other types of cells like immune cells (Simon, 2016).

High levels of inflammatory cytokines and angiogenic factors (e.g., hepatocyte growth factor, tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL-6), and metabolic growth hormones like insulin, glucose, leptin) are associated with higher risks of recurrence and cancer-specific mortality (Freire, 2020); (Bonatelli, 2020).

Chronic inflammation has been identified as an important risk factor for carcinogenesis. Inflammation might be linking with other factors such as increasing age, increased body fat, and neoplastic risk (Simon, 2016). Serum levels of C-reactive protein, an inflammation marker, are associated with a subsequent risk of CRC, and it is believed that inflammation might be involved in the early stage of colorectal tumor growth. (Cotti *et al.*, 2000); (From Lima & Maio, 2012).

Genes such as adenomatous polyposis coli (APC), deleted in colorectal carcinoma (DCC), protein P53, and others, have been identified as participants in the adenoma-carcinoma sequence. That is involved with tumor genesis based on the theory of multiple-steps, in which accumulating of genetic mutations in unstable cells is the main factor causing cancer (Souza, 2010); (Cotti *et al.*, 2000).

The beneficial results from regular exercise can be affected by the type of activity, duration, intensity, and total time practiced per week, making it complex to understand it (Pedersen, 2009).

Resistance and aerobic exercises can activate molecular pathways because of the different frequencies and mechanical loads imposed on muscles (Neves, Gonçalves & Ramalho, 2020). Aerobic exercise results in metabolic adaptations like increasing mitochondrial mass, oxygen supply, glucose uptake, and antioxidant capacity, whereas resistance exercise mainly cause an increase in muscle mass (Ballarò, Penna, Gómez & Cabrera, 2019)

Epidemiological studies have shown that regular exercise can delay the colon and bowel cancer onsets. Indeed, long-term aerobic training protects against chemically induced colon cancer (Harriss *et al.*, 2007).

Skeletal muscle cells secrete bioactive proteins from into the cell to the extracellular medium. Proteins secretion, which is increased in response to exercise, can regulate organs' function through autocrine, paracrine, and endocrine ways. Besides, that can mediate benefits induced by exercises like metabolic improvement, anti-inflammation, and muscle building; all this is called myokine theory (Aoi, Naito, Takagi & Yoshikawa, 2013). That provides a conceptual basis for understanding the mechanisms by which exercise can influence metabolism and have anti-

inflammatory effects. Skeletal muscle contraction releases myokines that work like hormones, causing endocrine effects (Pedersen, 2009).

Physical exercise can alter polyp development by improving immune system function and consequently reduce chronic inflammation. Furthermore, it can improve some cancer risk factors like immune system dysfunction, diet, obesity, insulin action, prostaglandin levels and triglycerides, antioxidant defense mechanisms (Lira, Vancini, Silva & Nouailhetas, 2008); (Da Silva *et al.*, 2020).

Animal research models have stood out to simulate most human tumors' characteristics (Abreu, Santiago, Abreu, Ramos, Neves & Ramalho, 2020). In vivo studies with animal models are considered critical tools required to study the molecular mechanisms of colorectal carcinogenesis, test Therapeutic Approaches, prevent and translate hypotheses derived from cell models (Johnson & Fleet, 2013).

Animal models can be used for chemoprevention studies, assess immunological, chemical, and surgical therapy regimes (Pantaleão & Luchs, 2010).

CRC rodent models can be genetically modified animals like Min/ Δ APC-mouse strains, which reproduce the tumors developing from epithelial cells initiated (mutated) to cover polyp growth through tumor progression and rarely metastases. That can also be a xenotransplant model that expresses growth tumor and its metastases when it used malignant cells, forming a tumor in animal hosts. Besides, chemical models for tumor induction can be used, in which acts on normal epithelium to form carcinomas and seldom metastases, through the multiple-stage process described above (De Robertis *et al.*, 2011)

The 1,2-dimethylhydrazine compound (DMH) and its metabolite, azoxymethane (OMA), are the two most used carcinogens substance to induce and promote colorectal cancer in rats and mice. DMH and OMA are alkylating agents injected intraperitoneally or subcutaneously over several weeks to induce the development of distal colon tumors. (Jucá *et al.*, 2014). Most of these tumors harbor mutations in the β -catenin (Cttnb1) gene, which is similar to hereditary colorectal cancer without polyposis (HNPCC) (Thaker, Shaker, Rao & Ciorb, 2012). These mutations affect the N-terminal amino acids of the β -catenin gene product, making the protein resistant to regulatory degradation, stabilizing β -catenin, and increasing WNT signal to boost the tumor's genesis (Johnson & Fleet, 2013).

Although of the broad knowledge about genetic factors involved in developing the diseases, only frequent mutations are used. Such as APC > 70%, p53 > 60%, and K-ras > 40%, present in sporadic CRC; APC in familial hereditary adenomatous polyposis; MMR in hereditary non-polypus colorectal cancer (De Robertis *et al.*, 2011). Genetically modified mice can recapitulate specific molecular precision etiologies relevant to human disease. (DE-Souza & Costa-Casagrande, 2018).

The animal model for cancer research is essential to develop new treatment strategies (Augusto Sobrinho *et al.*, 2019). This study investigates the physical exercise effects of physical exercise on colorectal cancer in rats and mice, which identified and analyzed the exercise results in tumor development. Based on molecular changes' hypothesis by the physical exercise related to colorectal cancer, we proposed to carry out this systematic review study in an animal model.

2. METHODS

This systematic review followed the recommendations proposed by the Cochrane Collaboration and by PRISMA Statement.

The Picot strategy was used to define the research question and the inclusion and exclusion criteria (an acronym for Patient, intervention, comparison, Outcomes or outcomes, and study type).

PICO

PATIENT: rats or mice with induced colorectal cancer

INTERVENTION: physical exercise, physical activity, aerobic exercise, anaerobic exercise, and combined exercises.

CONTROL: sedentary animals with induced colorectal cancer.

OUTCOME: result rate (positive and negative) to exercise on cancer, the result of exercise on tumor development

TYPE OF STUDY: Preclinical randomized controlled study carried out with rats and mice.

Eligibility criteria

Studies that assessed the resistance training effects were included based on the following criteria:

- a) Animal studies with induced colorectal cancer.
- b) Intervention research in which resistance and aerobic exercise training were used as a single. Intervention or as a part of the intervention.
- c) Control research in which includes a group that did a physical exercise of different intensity or another form of exercise or a non-exercising control group.
- d) The result from research in which have been reported results about the development of colorectal.
- e) Randomized clinical trial (RCT) published on the study design.

Exclusion criteria

Studies that used drugs, diet or another intervention beyond physical exercise were excluded.

Search sources

Selection of studies was on the databases: Latin American and Caribbean Center for Health Sciences Information (Bireme), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Pubmed), science direct, Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline), Spanish Bibliographic Index in Health Sciences (Ibics), Latin American & Caribbean Health Sciences Literature (Lilacs), Nursing Database (Bdenf), Bibliografía Nacional en Ciencias de la Salud Argentina (Binacis), physiotherapy Evidence Database (Pedro) and Scientific Electronic Library Online (Scielo). Besides, it searched for references studies already published about the subject, and there was no restriction of language or year of publication.

The search was carried out until December 2019 and followed combinations of medical subject heading terms (MeSH) descriptors: Colorectal cancer; Physical exercise; Mice and Rats.

Colorectal cancer: (Colorectal Neoplasm) OR (Neoplasm, Colorectal) OR (Colorectal Carcinoma) OR (Carcinoma, Colorectal) OR (Carcinomas, Colorectal) OR (Colorectal Carcinomas) OR (Colorectal Cancer) OR (Cancer, Colorectal) OR (Cancers, Colorectal) OR (Colorectal Cancers) OR (Colorectal Tumors) OR (Colorectal Tumor) OR (Tumor, Colorectal) OR (Tumors, Colorectal) OR (Neoplasms, Colorectal)

AND

Physical exercise: (Exercises) OR (Physical Activity) OR (Activities, Physical) OR (Activity, Physical) OR (Physical Activities) OR (Exercise, Physical) OR (Exercises, Physical) OR (Physical Exercise) OR (Physical Exercises) OR (Acute Exercise) OR (Acute Exercises) OR (Exercise, Acute) OR (Exercises, Acute) OR (Exercise, Isometric) OR (Exercises, Isometric) OR (Isometric Exercises) OR (Isometric Exercise) OR (Exercise, Aerobic) OR (Aerobic Exercise) OR (Aerobic Exercises) OR (Exercises, Aerobic) OR (Exercise Training) OR (Exercise Trainings) OR (Training, Exercise) OR (Trainings, Exercise).

AND

Mice: (Mus) OR (Mouse) OR (Mus musculus) OR (Mice, House) OR (House Mice) OR (Mouse, House) OR (House Mouse) OR (Mus domesticus) OR (Mus musculusdomesticus) OR (domesticus, Mus musculus) OR (Mice, Laboratory) OR (Laboratory Mice) OR) OR (Mouse, Laboratory) OR (Laboratory Mouse) OR (Mouse, Swiss) OR (Swiss Mouse) OR (Swiss Mice) OR (Mice, Swiss). rats (Rat) OR (Rattus) OR (Rattusnorvegicus) OR (Rats, Norway) OR (Rats, Laboratory) OR (Laboratory Rat) OR (Laboratory Rats) OR (Rat, Laboratory).

Studies selection

It followed two phases beyond eligibility criteria: Phase I - Two independent reviewers selected studies through reading the titles and abstracts that were selected to phase II at least one of the reviewers; Phase II – Complete selected articles analysis by both reviewers.

Data extraction

Two independent reviewers accomplish data extraction, using a standardized form that fills: authors, year of publication, training protocol description used on the intervention (volume, intensity, frequency, study duration), strength measures and results, alters in colorectal cancer status, comparison group description, assessment times, study results and authors' conclusions.

Bias risk

RoB tool for animal intervention studies (SYRCLE's RoB tool). This tool is based on the Cochrane RoB tool and has been adjusted for aspects of bias that play a specific role in animal intervention researches. The resulting RoB tool for animal studies contains ten entries:

1. Was the allocation sequence generated and appropriately applied?
2. Were the groups similar at the beginning of the study, or were they adjusted for confounding factors in the analysis?
3. Has the allocation appropriately been hidden?
4. Were the animals randomly housed during the experiment?
5. Did the caregivers and/or researchers go blind to know what intervention each animal received during the experiment?
6. Were the animals selected at random to evaluate the results?
7. Did the result appraiser go blind?
8. Were incomplete results data appropriately handled?
9. Are study reports exempt from selective results reports?
10. Was the study free of other problems that could result in a high risk of bias?

These entries are related to selection bias, report bias, detection bias, attrition bias, performance bias, and other biases (Hooijmans Rovers, De Vries, Leenaars, Ritskes, Hoitinga & Langendam, 2014)

Two independent reviewers performed the bias risk and studies' methodological quality assessments. When necessary, the reviewers' disagreements were resolved through discussion and consensus, or even through a third reviewer. The total score ranges from 0 to 10 points, with a score of 6 or higher considered high quality; RCTs with less than six were considered low quality.

Summary measures

Results were put in Summary Tables that contained seven entries with study data about author and year, objective, intervention group, control group, induction type, and results about tumor development comparison between treated and control groups.

3. RESULT

A total of 1722 studies were found through an electronic database search, of which 1225 were selected for titles and abstracts analysis, of which 1182 were excluded for not fulfill the eligibility criteria requirements. As a result, 43 abstracts were selected and assessed to a full reading. After full-text evaluations, 13 studies were selected.

Figure 1 shows the steps taken to selected and the reasons for excluding some studies.

In Tables 1 and 1.1, the Cochrane RoB Tool assesses the bias risk in the included studies by addressing the following bias types: selection bias, performance bias, attrition bias, detection bias, and reporting bias.

Bias risk graphs 1 and 1.1 show the authors' judgments about each item bias risk, represented as a percentage.

In Table 2 and 2.2, The characteristics of included studies are described, following the items: author, year of publication, study design, study subjects, division of groups, analyzed variables, and results.

Figure 1: Shows the steps are taken to selected and the reasons for excluding some studies.

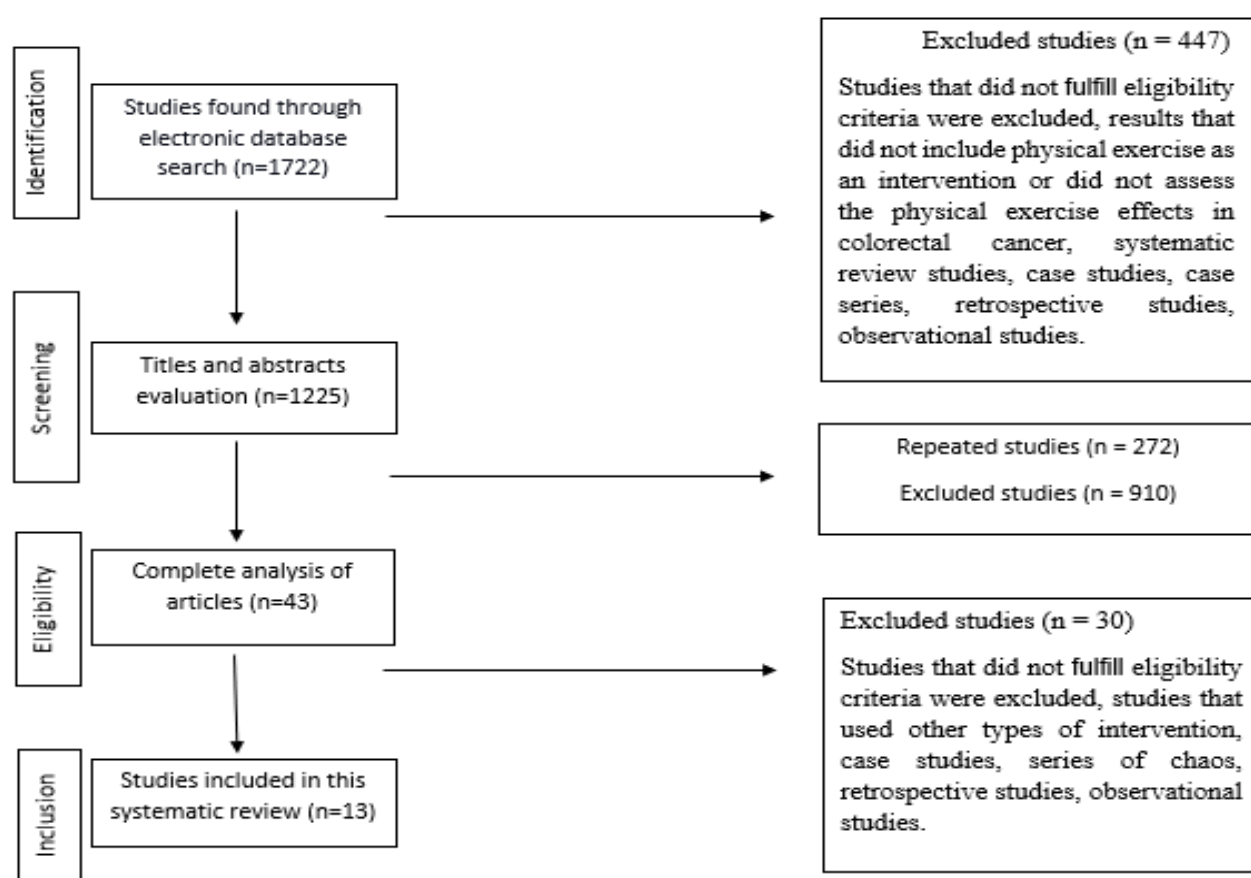
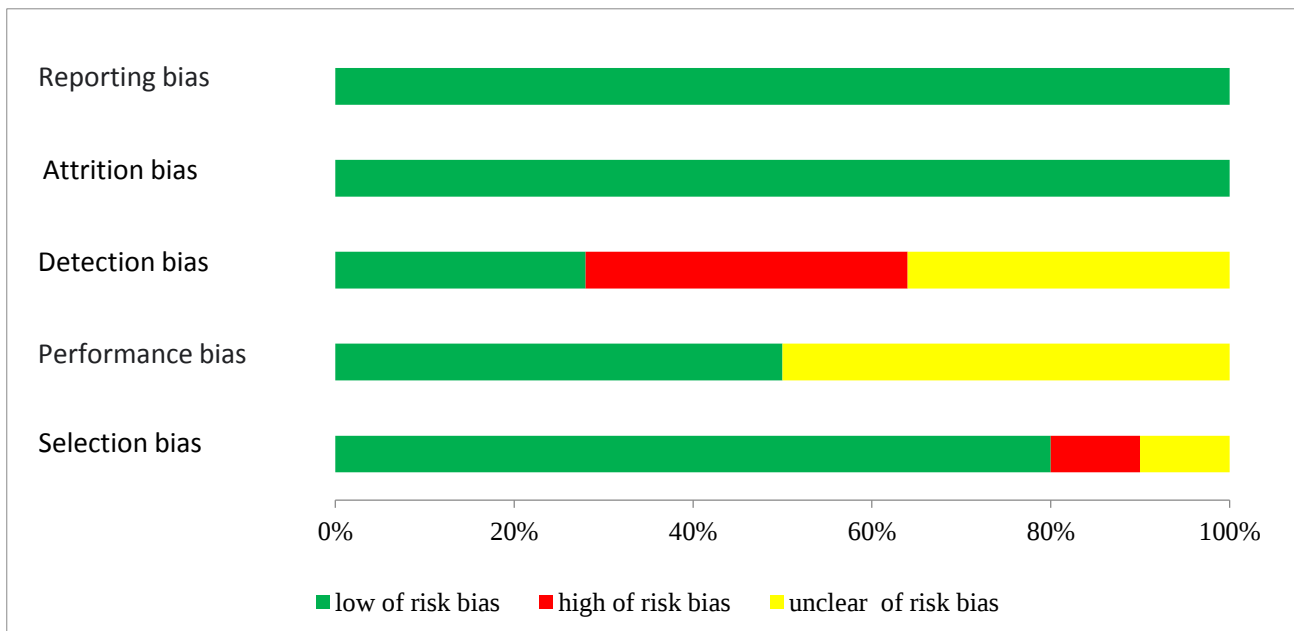


Table 1 Summary of bias risk': Note the authors' judgments about each item of bias risk for each included study. Risk assessment of bias in studies with rats.

	Study 1	Study 2	Study 3	Study 4	Study 5	Study 6	Study 7
	Lunz <i>et al.</i> , (2008)	Demarzo <i>et al.</i> , (2004)	Kaori <i>et al.</i> (2017).	Demarzo <i>et al.</i> ,(2008).	Bandaru <i>et al.</i> ,(1998)	Fuku <i>et al.</i> ,(2007)	Thorling <i>et al.</i> , (1993)
1.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2.	Yes	Yes	Yes	Yes	Not	Yes	Yes
3.	Not	Unclear	Yes	Yes	Yes	Yes	Unclear
4.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5.	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear	Unclear
6.	Yes	Yes	Unclear	Not	Not	Not	Yes
7.	Unclear	Yes	Unclear	Unclear	Not	Unclear	Not
8.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Graph 1 of bias risk: note the authors' judgments about each item of bias risk in all included studies with rats.

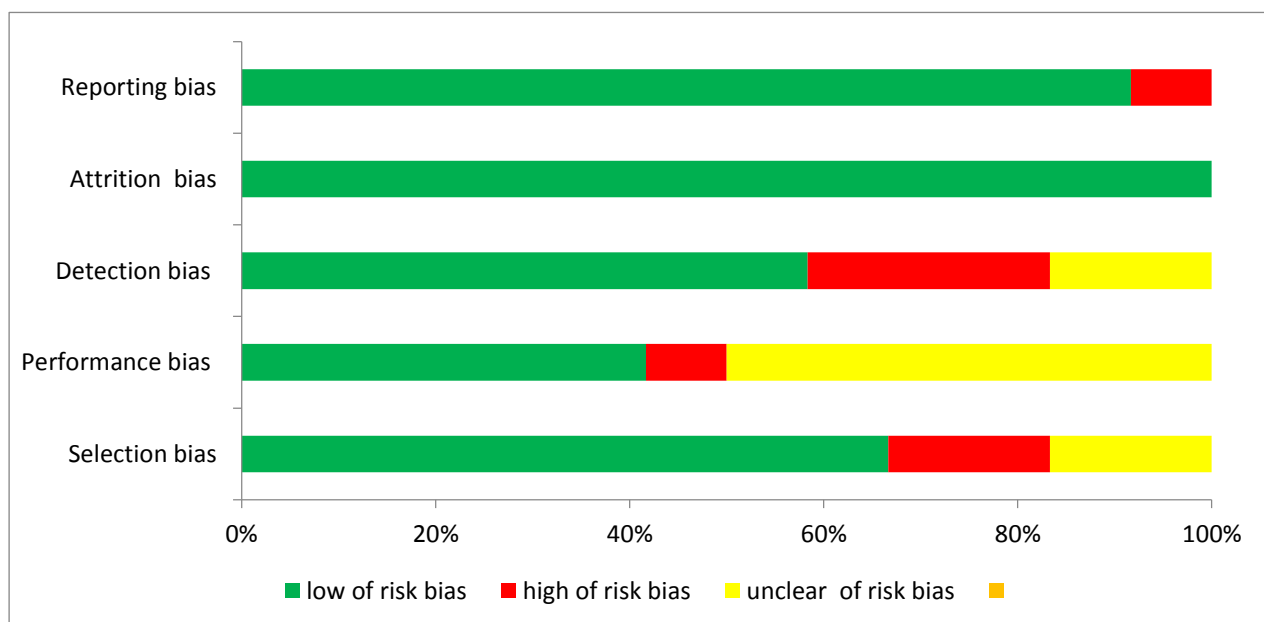


In the selection bias, study 5 didn't describe if the intervention and control groups were or weren't similar at the beginning of the experiment. Study 1, 2, and 7 didn't present enough details to set if the intervention allocations could have been predicted before or during the subscription. In the bias of performance, all the studies presented uncertainties about the researchers blinding of knowing which intervention itch animal received. In the bias of study detection, 1 and 3 presented uncertainties, and 4, 5, and 6 didn't describe if the animals were or weren't randomly selected for results evaluation and which methods and measures were used to select the animal, for blinding the results evaluations of knowing which intervention itch animal received. In the bias of attrition, all of them described the results data integrity for the main itch result. In the bias of the report, all the studies presented selective results report and how it was examined, and what was found.

Table 1.1 Summary of bias risk': Note the authors' judgments about each item of bias risk for each included study. Risk assessment of bias in studies with mice.

	Study1	Study2	Study3	Study4	Study5	Study6
	Wataru <i>et al.</i> , (2010)	Kristem <i>et al.</i> , (2008)	Kelly <i>et al.</i> , (2017)	Aoi <i>et al.</i> , (2013)	Colbert <i>et al.</i> , (2000)	Frajacomo <i>et al.</i> , (2015)
1.	Unclear	Yes	Yes	Unclear	Yes	Yes
2.	Yes	Yes	Yes	Not	Not	Not
3.	Yes	Yes	Unclear	Yes	Yes	Yes
4.	Yes	Yes	Yes	Unclear	Yes	Yes
5.	Unclear	Unclear	Not	Unclear	Unclear	Unclear
6.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7.	Unclear	Not	Not	Unclear	Not	Yes
8.	Yes	Yes	Yes	Yes	yes	Yes
9.	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10.	Yes	Yes	Yes	Not	Yes	Yes

Graph 1 of bias risk: note the authors' judgments about each item of bias risk in all included studies with mice.



In the selection bias, the study 1 and 3 didn't describe how and if the groups of intervention and control were or weren't similar at the beginning of the experiment, studies 4, 5, and 6 didn't describe the criteria used to compare and judge if the intervention and control groups were or not similar at the beginning of the experiment. In the performance bias, all the studies didn't describe with clarity the measures used to blind caretakers and researchers to know which interventions itch animal received, and if the animals were or not randomly selected for results evaluation and which methods were used to select the animals if there is any. In the detection bias, studies 2, 3, 4, and 5 didn't present all the measures used to blind results evaluators of knowing which intervention itch animal received. In the attrite bias, all of the studies described the integrity of the results data for itch main result, attrite and exclusion of analyses included. In the reporting bias, all of the studies presented selective results of what was examined and found.

Table 2: Characteristics and results of studies included in rats in this review.

Author, year	Objective	Subject	Intervention group	Control group	Kind of induction	Results
Lunz, Peluzi, Dias, Moreira, Natali, (2008).	To check the effects of aerobic training regime of long term swimming of different intensities in the colon carcinogenic process	Male Wistar rats .	3 swimming groups in different intensities During 35 weeks by 20 min/day, 5 days/week. G1=0% of the body weight (n=12) G2=2% of the body weight (n=12) G3= 4% of the body weight	Sedentary control group (N = 10)	In the second week of experiment, all the rats received 4 subcutaneous injections of 40mg/Kg of weight body of 1,2-dimethyl-hydrazine (sigma, EUA), two injections in the first week and two in the 2nd week, in nonconsecutive days	The swimming training didn't affected the tumor multiplicity (GC: $2,30 \pm 0,58$; GE1: $2,09 \pm 0,44$; GE2: $1,27 \pm 0,19$; GE3: $1,50 \pm 0,48$) or size (GC: $1,78 \pm 0,24$; GE1: $1,81 \pm 0,14$; GE2 : $1,55 \pm 0,21$; EG3: $2,17 \pm 0,22$ cm) The number of small ACF (ACF ≤ 3) in the EG2 also was significantly reduced compared to GC ($61,00 \pm 5,98$ vs. $85,00 \pm 4,73$ crypts, respectively)
Demarzo , Garcia (2004)	To check the influence of the exhaustive exercise in colon carcinogenesis in rats not trained.	Ratos Wistar males 30 days after the birth	Swimming exercise group until the exhaustion with weight a equivalent to 2% of it (n=8)	Control (n=8) was maintained in a small chamber with 3cm of water	Only injection of 1,2- dimethyl-hydrazine (50 mg/Kg of body weight)	The number of focus in the exercise group was $10,85 \pm 3,20$ by microscopic field and $3,72 \pm 0,70$ in the control group. The LAC number increasing in the exercise group was statistically significant ($P < 0,01$). Most of the ACF appeared in the middle and distal colon in both groups.
Kaori <i>et al.</i> (2017).	To investigate the mechanism that can explain the high-intensity physical exercise efficiency in the reduction of colon cancer, with a focus on the acid and cysteine-rich secreted protein (SPARC)	344 Fischer male rats 4 weeks old	Training in high-intensity swimming, 12 sections of the 20s, with 16% of its body weight, a pause of 10s, between the exercise sections for five days/week during four weeks. (n=8). Swimming training of low intensity 2.	Sedentary control group (n=8)	Subcutaneous injection of 1,2- dimethyl-hydrazine 20mg/Kg of body weight 1 a week, for 2 weeks.	The ACF numbers were less significant in the high-intensity group compared with the control group ($P < 0,05$). The number of LAC seem in the high intensity (14 ± 10) were significantly low compared to control groups (23 ± 14) ($P < 0,05$). The SPARC protein levels of the high-intensity trained rats were significantly higher than the seen in the other control groups. ($P < 0,05$)

Demarzo <i>et al.</i> , (2008).	To confirm the existence of the early inhibitory effect efficiency of the exercise against the colon carcinogenesis, studying the proliferation of the epithelial cells and check the exercise influence in the COX-2 expression.	Male Wistar rats, 30 days after the birth	Group 2 (n=8), eight weeks of swimming training, 5 days/week. Group 4 (n=8), 8 weeks. Swimming training, 5 days/week + DMH injection, first week they swam for 15 min. daily. The second week, 50 min., then 10 min. until the 6 th week 90min.	Sedentary group 1 (n=8). Sedentary group 3 + DMH injections (n=8)	dimethyl-hydrazine DMH (50mg.Kg – body weight)	The physical training attenuates the increase related to DMG in the epithelial cells proliferation and in the COX-2 expression in the rat's colon mucosa. However, this increase was significantly attenuated in the training group G4 (P<0,01). Similar results were seen related to COX-2 expression.
Bandaru, Reddy, Sugie, Lowenfels, (1988)	To investigate the volunteer exercise effect in the colon carcinogenesis induced by OMA in male rats F344	F344 male rats	Volunteer wheel exercise, free access + OMS (n=27) Volunteer wheel exercise (n=12)	Sedentary + OMS (n=27) sedentary (n=12)	OMA for 2 weeks with a doses level of 15mg/Kg.	The incidence and multiplicity of colon adenocarcinoma were significantly inhibited P < 0,05 in the exercise group when compared to the sedentary, but the incidence and multiplicity of colon adenomas weren't affected by the exercise.
Fuku, Ochiai, Terada, Fujimoto, Nakagama, Tabata, (2007)	We examined the running machine training effects in the induction of the aberrant crypts focus (ACF)	F344 rats, 4weeksold	Running training in the running machine (N=19) for 120 min. d- (two sections of 60 min separated by 10 min of rest, 5 days a week, for 4 weeks.	Sedentary control (N=19)	Subcutaneous injection of 1,2-dimethyl-hydrazine DMH, 20mg/Kg of body weight, once a week, during 2 weeks.	The number of rats ACF of the training group was significantly less than seen in the control group (P < 0,05). The total CA number was also considerably less in the training group than the control group (P < 0,05). However, the proportion of AC/total ACF, which indicates the medium size of induced ACF, didn't differ significantly between training and control groups (2,9 ± 0,2 vs. 2,9 ± 0,7, P> 0,10).
Thorling, Jacobsen, Overvad, (1993).	To evaluate the exercise effect the intestine tumor development in Fischer male rats after the exposition to the azoxymethane	Fischer male rats	Exercised in the running machine, 2km a day in useful days, 38 weeks after the induction by azoxymethane	Sedentary control (n=16)	3 subcutaneous injections of azoxymethane, 15mg/kg of body weight.	After 38 weeks, significantly fewer rats in the exercise group developed neoplasm in the colon mucosa.

Table 2.1: characteristics and results of studies included in mice in this review.

Autor, ano	Objetivo	Sujeitos	Grupo Intervenção	Grupo Controle	Tipo de indução	Resultados
Wataru <i>et al.</i> , (2010)	To investigate the exercise effect in colon tumorigenesis associated with iNOS and COX-2	Balb mice (8weeks old)	OMA group with running exercise (n=2-) in the running machine regular 3 weeks, during 6 weeks Speed of 15m/min until 30min to 20m/min (n=20)	Sedentary group (n=20)	Dose of 12,5mg/Kg of body weight, once a week, during 2 weeks.	Compared to the sedentary group, the exercise group presented a significant reduction in the ACF and AC number $p<0,05$. The injection of OMA sharply increased the expression of mRNA of iNOS in the colon, while the regular exercise suppressed this elevation.
Baltgalvi, Berger, Peña, Davis & Carson, (2008)	To determine if the exercise changes the polyps signaling related to inflammation and growing.	Mice <i>Apc</i> ^{Min/+} males 3,5 weeks.	Exercise (n= 20) run in the running machine 18 m/min; 60 min/dia; 6 days/week; 5% of degree), totalizing 9 weeks.	Sedentary control (n= 20)	Mice with a mutation without 850 codon sense in the gene <i>Apc</i> (<i>Adenomatous polyposis coli</i>) predispose the small and big intestine adenomas.	Nine weeks of running machine training produced a decrease of 35% in positive cells for macrophages, F4/80 in the polyps; ($P= 0,010$). The protein COX-2 total didn't change with physical training ($P= 0,835$). The exercise didn't have an effect in the accumulated by β -catenin in polyps with a low number of focus ($P= 0,275$) or in a bug number of focus ($P= 0,420$;
Kelly <i>et al.</i> , (2017)	To examine the genetic background effects (tension), volunteer exercise (wheel run), and its number interaction in the intestine tumor's number and size.	Mice lineage (C57BL6 A/J, C57BL6/J, C58/J, KK/HIJ, I/LNJ) With approximately 8 weeks old	G1= (n=15) female, each one on the six lineages G2= (n=12) males A/J and (n=12) females, 5 weeks of access to a running wheel before induction, 5 weeks of access to the wheel after induction.	Sedentary (n=x)	2injectionsof OMA	Between exercise, conditions indicated that the access to a running wheel or whatever moment had a significant reduction statistic in the tumor numbers in relation to any exercise ($P<0,03$). The regression analyses revealed the distance wheel of functioning to a significantly proportion of variance in tumor number ($R = -0,646, R^2 = 0,418, P = 0,044$).
Aoi <i>et al.</i> , (2013)	To identify new myosin to contribute to the prevention of colon.	Null SPARC mice (B6; 129S-Sparc ^{tm1Hwe} / J) and savage mice.	Group 1= 6 weeks of regular exercise, Group 2 = only exercise section.	Sedentary mice.	Azoxymethane (AOM) 15 μ g/kg	ACF and AC were made in null SPARC mice treated with AOM of the savage mice. The exercise didn't have an inhibiting effect. More ACF and were made in null SPARC mice treated with AOM than in savage mice, and the exercise didn't have an inhibiting effect.

Colbert, Davis, Essig, Ghaffar, Maye, (2000).	To examine the effect of physical training in the development of the polyp in a mutant mice strain induced predispose to multiples intestine neoplasm.	Male heterozygous mice C57BL/6 J-Min/n+ and female C57BL/6 of 3 weeks old.	Running (11 males +11 females N= 22) exercise in the running machine 60 min in the growing speed of 18 to 21 m min, for 7 weeks.	Sedentary (10 males, 6 females n=16)	Induced with etil-nitrosureia mice, and predispose to multiples intestine neoplasm.	Combined analyses between female and male didn't revealed exercise effect over small intestine polyps effects(P= 0,50), colon (P= 0,17) or total intestine (P= 0,44). There wasn't a difference between sedentary and exercised in the female to any intestine location(P> 0,05). There was a tendency to less polyps in excited male mice in the colon(P= 0,06), small intestine (P= 0,08) and total intestine (P= 0,06).
Frajacom o <i>et al.</i> , (2015)	To demonstrate that physical exercise is a protector against colon carcinogenesis.	BALB male mice with interleukin 10 (IL-10)	Aerobic group (n, MNNG=8) Aerobic group (not exposed, n=8) 5 days swimming without during 56 days, 20 min. (first week.) to 60 min (3rd week) resistance group (n= 8) 80 stair inclination; 1 cm space between the steps and high of 50cm) 7 climbing for 2min to recovering.	Exposed sedentary MNNG (S,n= 6) Not exposed sedentary (n=6).	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG).5 mg mL ⁻¹ ;intrarectal deposit of 100 µL; twice by week, during 2 week.	The training with aerobic exercise was related to a significant increase in IL-10 levels between carcinogen agents exposed mice (p<0,001). The aerobic training reduced the colon dysplastic lesions in 36% of the sedentary group exposed to carcinogens agents (P<0,05). This protector effect wasn't seen between trained mice in IL-10 resistance exposed to carcinogens agents development 20% more of dysplastic lesions that its antecedents of (C57/BL6 (1,68 ± 0,91) vs IL-10 ^{-/-} (8,69 ± 8,3 total displasm for m2)) (P= 0,01.);

4. DISCUSSION

The results presented that light and moderate-intensity physical exercise were capable of reducing tumor development but didn't prevent its emergence, presenting that the exercise can be an ally in colorectal cancer treatment. Found results indicated that the physical exercise generated a direct response in growing circulants factor, cytokines and angiogenic factors, hormones and several other kinds of cells which have the potential of tumor development, immune cells included, presenting possible responses of physical exercise over the tumor development.

A study of Lunz, Peluzi, Dias, Moreira, and Natali (2008) presents that different intensity of swimming exercise didn't reduce the colorectal cancer development compared to the control group; only the 2% intensity reduced the cancer development, but not against DMH induced tumors, these results suggest that the intensity of the exercise makes a central in this process, even below the anaerobic threshold.

Bandaru, Reddy, Sugie, and Lowenfels (1988) also presented in their study the volunteer wheel exercised animals when compared to the sedentary animals, the colon adenocarcinoma, induced by OMA, incidence, and multiplicity were significantly inhibited, but the colon adenoma incidence and multiplicity weren't affected by the exercise.

The exercise promotes the physiologic adaptation in the homeostatic control circuit; with it, such adaptations stimulate the systemic surroundings reprogramming, potentially characterized by availability, mobilization, recruitment, retention, and function of kinds and/or specific cell of molecule alterations. The exercise activates a diversified network of transcription factors, kinases, and coregulator proteins that culminate in genic expression alterations that raise the mitochondrial biogenesis and stimulate the skeletal muscle metabolic reprogramming (Koelwyn, Quail, Zhang, White & Jones, 2017); (Brown, Winters-Stone, Lee & Schmitz, 2012). Regular exercise reduces the levels of glucose and insulin, elevates the levels of corticosteroids hormones and of anti-inflammatory cytokines, and raises the receiver's expressions of insulin in the cells that fight cancer. (Spinola, Souza Manzzo & DaRocha, 2012).

Fuku, Ochiai, Terada, Fujimoto, Nakagama, Tabata, (2007). The low intensity running training inhibits the development initiation of ACF aberrant crypts focus of the DMH colon induced. ACF aberrant crypts are the first identifiable neoplasia lesions in the carcinogenic colon model. The ACF progression to polyp and, posteriorly, to cancer is parallel to the accumulation of several biochemistry alterations and mutations, in which a small fraction of ACF evolves to colon cancer (Alrawi *et al.*, 2006); (Gupta Pretlow & Schoen, 2006).

The exercise can change the events to the tumor initiation modifying the carcinogen activation, specifically improving the cytochrome P450 system and the selective enzymes by way of carcinogen detoxification, including, among others, transferase-S-glutathione. Besides, the exercise can reduce oxidative damage, increasing the level of an antioxidant enzyme variety, improving the DNA and intracellular proteins repair systems (Silva, Sivieri & Rossi, 2009).

Thorling, Jacobsen, and Overvad (1993) study, after 38 weeks, significantly fewer rats of the exercise group develop colon mucous neoplasia. The precocious beginning of the physical exercise execution decreases the inflammation; it protects against several kinds of cancer and increases the life expectancy of natural-age mice (Nilsson *et al.*, 2019).

Demarzo e Garcia (2004) presented that only an exhaustive exercise section was associated with an increased number of aberrant colonic crypts in rats not trained treated with DMH when compared with the control group animals. The resisted and aerobic exercise can activate different metabolic ways due to the different intensities and mechanical loads imposed on the muscle. In fact, aerobic exercise results in different metabolic responses, resulting in an increase of mitochondrial mass, oxygen contribution, glyucose capitation, and antioxidant capacity (Galle, Martella & Bresciani, 2018). Exhaustive swimming exercises originate from tissue damage, regardless of the trained condition, according documented by similar levels of muscle lipid peroxidation and mitochondria integrity loss, and reactive species found in trained and not trained exhausted rats (Ferraresso, 2010).

The oxidative stress reflects an unbalance between the species production that is reactive to oxygen and adequate antioxidant defense. This adverse condition can take it to cellular and tissue damage in the components, and it is involved in different physiopathology conditions, including aging, exercise, inflammatory, cardiovascular and neurodegenerative disease, and cancer (Pingitore *et al.*, 2015).

High oxidative stress and the function of immune depression can make de colon carcinogenesis easier. Besides the regular physical exercise have many health benefits well establish. The exercise effect over immune functions, like macrophages and lymphocytes, suggests that middle-intensity exercise get better the immune function, while exhaustive exercise promotes immune suppression (Nieman & Wentz, 2019); (Carini *et al.*, 2017).

Kaori *et al.* (2017) study. It presented that the intermittent swimming of high intensity reduced the number of ACF induced by DMH in the rat's colon, suggesting the high-intensity training can be a preventive effect in colon cancer. The results also suggest that the secreted protein, acidic and full of cysteine (SPARC), a myosin whose expression is regulated by intensity related signals of 5'-monophosphate-adenosine kinase activating protein (AMPK), can interfere in the effect of the high-intensity physical training in the prevention of colon cancer.

The SPARC, also nominated osteonectin or basement membrane-40, is a matrix-associated protein that provokes alterations in the cellular form; it inhibits the cellular cycle progression and affects extracellular matrix syntheses (Brekken, 2000). In some tissues, it seems to have tumor suppressor properties by check inhibition of some kinds of cancer growing. In the skeletal muscles, the SPARC in the colon cancer with chemotherapy reduced sensibility, and it presented that the resistant reversion to therapy could be achieved through the positive regulation of SPARC expression or of the exogenous exposure in higher levels of SPARC. (Cheetham *et al.*, 2008); (Wang *et al.*, 2014).

AMPK is a protein complex/Ser kinase protein/Thr highly preserved, which is another potential candidate to regulate autophagy through the maintenance of energetic homeostasis. The molecular mechanism of AMPK regulates the autophagy is usually assumed by the inhibition of the mTOR, which actuates in the initial step of autophagy, that regulates it negatively. Recent discoveries presented that the AMPK activation is critical to the biosynthetic activity maintenance of the cancer cells (Liu *et al.*, 2019); (Hart *et al.*, 2015).

Demarzo *et al.* (2008), in this exercise results, reduced the colonic expression of the cycle-oxygenase-2 (COX-2). It is known that colonic carcinogenesis is associated with the COX-2 expression increasing that takes to excessive production of prostaglandin E2. The physical training exerts notable anti-proliferative and anti-inflammatory effects in the rats' colonic mucosa, suggesting that this can be an important mechanism to explain how the exercise protects de colon cancer (Lunz, Moreira & Viana, 2006).

About 85% of the colon and rectum present elevated levels of COX-2. Literature reports suggest that the polymorphism in an only nucleotide (SNP) in the gene COX-2 could be capable of modifying the enzyme function and, this way, amplify the risk of an individual to develop colon cancer (Cossio, Costa, Fernandes, Laranjeira, Fernandes & Poli-Frederico, 2017).

The exercise significantly inhibits the COX-2 activity, taking to pro-inflammatory cytokines suppression and redox status alterations. The found result presented that the exercise prevented morphologic alterations triggered by high fat, reducing the COX-2 expression in the proximal and distal intestine (Campbell *et al.*, 2016); (Eberhart, Coffey, Radhika, Giardiello, Ferrenbach, Dubois, 1994); (Lee, Yang, Huang, Huang, Kao & Chen, 2015).

Chronic inflammation is connected to the development of several cancers. The intestine inflammation induces carcinogenic mutagenesis and promotes colorectal cancer beginning (Chen, Pitmon & Wang, 2017). The inflammatory environment has many similarities with the tumor microenvironment, suggesting the implication that the same mediators in the chronic intestine inflammation and in colorectal carcinogenesis. Many inflammatory mediators were found positively associated with colorectal adenomas prevalence (Lucas, Barnich & Nguyen, 2017).

The result of Wataru *et al.* (2010) regular exercise suppressed the genesis of aberrant crypts focus in the colon by azoxymethane. The azoxymethane injection raised the expression of nitric oxide syntheses (iNOS) in the colon, while the regular exercise suppressed this raising. The COX-2

wasn't changed by the OMA or by the exercise. The tumor necrosis factor alpha (TNF α) was reduced by the exercise in the colon and in the plasma.

INOS is an enzyme predominantly expressed during inflammatory reactions. However, the syntheses of large quantities of nitric oxide (NO) by the INOS have been demonstrated in the physiopathology process, as acute or chronic inflammation and tumorigenesis. The INOS gene expression enhanced to production is probably the mechanism that contributes to the increasing of the exercise-induced cytotoxicity (Gochman *et al.*, 2012); (Bellafiore, Battaglia, Bianco & Palma, 2019).

According, the exercise increases the mRNA expression of the alpha X receptor transporter and of the ATP ligation cassette, and it reduced to inducible synthase nitric oxide (iNOS), the cyclooxygenase-2 (COX-2), the tumor necrosis factor alpha (TNF α). The protein iNOS is modulated by a moderate-intensity exercise (De Castro *et al.*, 2019).

In the study by Kristen *et al.* (2008) the physical exercise reduced the macrophage number in the polyps by 35%. In relation to the apoptosis, the exercise reduced by 73% of the positive cells number to terminal marking (TUNEL). The exercise reduced the macrophage number in the polyps by 35%. The original hypothesis proposed that the macrophages were involved in the anti-tumor immunity; there is clinical and experimental substantial evidence that, in most of the cases, these macrophages associated with tumor (TAM) increase the tumor progression to malignity. The tumor-promoting functions of macrophages in the primary local include the support to angiogenesis associated with the tumor, invasion of promotion, migration, and tumor cells intravasation, as the suppression of the anti-tumor immune response. (Rosa, Bicudo & Vaisber, 2012). The macrophages also potentiate sowing and the establishment of the metastatic cell and play a role in the tumor initiation when the inflammation is a causal factor (Qian & Pollard, 2010).

The Kelly *et al.* (2017) volunteer exercise before or during the OMA treatment resulted in a significant reduction in the tumor numbers, but in exercise before the OMA explosion, it had no effect.

Exercise used studies as an intervention in animals as tumors presented potential changes in the tumor physiology. It was demonstrated that the exercise reduces the incidence and multiplicity and the growth of the different kinds of xenograft, chemically induced, or genetically induced, emerging mechanistic effects of exercise, including bloody vascularization and perfusion, immune function, tumor metabolism, and cross conversation between muscle and cancer (Pedersen, Christensen & Hojman 2015).; (Ruiz-Casado *et al.*, 2017).

Aoi *et al.*, (2013) in mice, an only exercise section increased the SPARC expression and secretion in the skeletal muscle in rats and humans. Besides that, in an azoxymethane mouse model with induced colon cancer, regular low-intensity exercise significantly reduced the crypts aberrant focus formation in savage mice, but not in SPARC-null mice. Besides that, the regular exercise improved the apoptosis in mucosa colon cells, and it increased the cleaved forms of caspase-3 and caspase-8 in savage mice, but not in SPARC-null mice.

The caspase-3 promotes the tumor growing, providing a pro-angiogenic microenvironment. Besides that, the dying cancer cells promote the restocking of tumor cells after chemotherapy. In human patients with colon cancer with low levels of activated caspase-3 had a long time of disease-free survival.

Studies presented that the caspase 3, 8, and 9 levels expression are useful prognoses factor in cancer-related to the digestive system, especially in colorectal cancer (Liu Saber & Haisma, 2019) (Asadi *et al.*, 2018).

Colbert, Davis, Essig, Ghaffar, Maye (2000). There were no significant effects in the exercise in males and females combined in the small intestine, colon, or total intestine polyps. When separately analyzed, however, there were total polyps in the exercised male group than in the control males, although the difference hasn't been statistically meaningful. The aerobic training reduced the number of colon dysplasia lesions by 36% compared to the sedentary group exposed to cancer agents. This protector effect wasn't seen in resistance trained mice.

The exercise induces adaptations in multiple cell processes in the skeletal muscle, including metabolism, angiogenesis, and immune regulation. The depletion of the ATP and NADH levels elevate the AMP: ATP and NAD⁺: reasons NADH, activation several metabolic sensors, including the NAD (SIRT1) dependent sirtuin deacetylase one protein and kinases as the activate kinase protein by AMP (AMPK), ERK1/2, p38 MAPK, and kinase N-terminal (JNK) (Abreu, Leal-Cardoso & Ceccatto, 2017). These metabolic sensors activate the alpha receptor co-factor activated by one alpha peroxisome proliferator (PGC1alpha), that regulates the mitochondrial protein expression coded in nuclear and mitochondrial genomes by the interaction with several factors in the transcription, as the activated receptor by peroxisome proliferator (PPARgamma), receptor alpha-related to estrogen (ERRalpha), ERRgamma, nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and NRF2. The NRF1 also increases the mitochondrial transcription factor to tumor metabolism. (Koelwyn *et al.*, 2017); (Yu *et al.*, 2013).

5. CONCLUSION

Based on the experimental studies in found animal models, suggest that the resisted and aerobic and resistance exercise training can reduce several risk factor, as, reducing the systemic pro-inflammatory condition, induced by the tumor, reducing oxidative muscle stress and muscle damage, improving the anti-inflammatory system through the regulation of cytokine network, strengthening the defenses of the immune system and helping to keep the suitable body weight, reducing the cyclooxygenase3 expression, related to the colon inflammation. With this, it presents the practical importance of physical exercise to colorectal cancer prevention and treatment. The suggested exercise and physical activity demonstrate the need for hypothesis refinement that only will be achieved with well-directed and controlled experimental studies. Once that the colorectal cancer protection by the exercise and physical activity is considered convincing by the found evidence. It becomes fundamental that the new studies involving exercise and CC seek to explore the biologic mechanism of protection, so, this way, can be possible to understand the mechanism deeply of the exercise in colorectal cancer, and to do the prescription and practice of physical exercise that is directed specifically to colorectal cancer prevention and treatment.

7. REFERENCES

- Abreu, A. C., Santiago, E. M. L., Abreu, G. R. ; Ramos, E. M. ; Neves, M. B. ; Ramalho, R. T. (2020) . A Murine Experimental Models In Carcinogenesis Studies Are Efficient? International Journal for Innovation Education and Research, 8(1), 213-219. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol8.iss1.2153>
- Abreu, P., Leal-Cardoso, J. H., Ceccatto, V. M. (2017). Adaptación Del Músculo Esquelético Al Ejercicio Físico: Consideraciones Moleculares Y Energéticas. Revista Brasileira De Medicina Do Esporte, 23(1), 60-65. <http://dx.doi.org/10.1590/1517-869220172301167371>

Alrawi, S. J., Schiff, M., Carroll, R. E., Dayton, M., Gibbs, J. F., Kulavlat, M., Anderson, G. R. (2006). Aberrant crypt foci. *Anticancer research*, 26(1A), 107-119.

Aoi, W., Naito, Y., Takagi, T., Yoshikawa, T. (2013). Unraveling The Function Of Skeletal Muscle As A Secretory Organ. *Nutrition And Enhanced Sports Performance*, 305. [doi:10.1152/physiol.00019.2013](https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2013)

Aoi, W., Naito, Y., Takagi, T., Tanimura, Y., Takanami, Y., Kawai, Y., Sakuma, K., Hang, L. P., Mizushima, K., Hirai, Y., Koyama, R., Wada, S., Higashi, A., Kokura, S., Ichikawa, H., Yoshikawa, T. (2013). A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. *Gut*, 62(6), 882–889. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300776>

Asadi, M., Shanehbandi, D., AsvadiKermani, T., Sanaat, Z., Zafari, V., Hashemzadeh, S. (2018). Expression Level of Caspase Genes in Colorectal Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(5), 1277–1280. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.5.1277>

Augusto Sobrinho, C., de Lima Santiago, E. M., Barbosa Neves, M., de Figueiredo Gonçalves, A., Miranda Ramos, E., Dutra Aydos, R., Ramalho, R. (2019). Perspectives Of The Use Of Sulforaphane In Animal Model Of Colorectal Carcinogenesis In Brazil: A Review. *International Journal for Innovation Education and Research*, 7(12), 421–427. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol7.iss12.2088>

Ballarò, R., Penna, F., Pin, F., Gómez-Cabrera, M. C., Viña, J., Costelli, P. (2019). Moderate Exercise Improves Experimental Cancer Cachexia by Modulating the Redox Homeostasis. *Cancers*, 11(3), 285. <https://doi.org/10.3390/cancers11030285>

Brekken, R. A., Sage, E. H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix. *Matrix Biology*, 19(7), 569-580.. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00105-0)

Baltgalvis, K. A., Berger, F. G., Peña, M. M. O., Davis, J. M., & Carson, J. A. (2008). Effect of exercise on biological pathways in Apc Min/+ mouse intestinal polyps. *Journal of Applied Physiology*, 104(4), 1137-1143.. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00955.2007>

Bandaru, S., Reddy, S., Sugie, A., Lowenfels.(1988). Effect of Voluntary Exercise on Azoxymethane-induced Colon Carcinogenesis in Male F344 Rats. *Cancer Res* December,(48),7079-7081.

Bellafiore, M., Battaglia, G., Bianco, A., Palma, A. (2019). Expression Pattern of Angiogenic Factors in Healthy Heart in Response to Physical Exercise Intensity. *Frontiers in physiology*, 10, 238. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00238>

Bonatelli, A. A. B. (2020). Proposal for a screening and treatment protocol for early colorectal cancer in military health organizations of the Brazilian Army. Course Conclusion Paper (specialization) - Army Health School, Postgraduate Program in Applications Complementary to Military Sciences.

- Brown, J. C., Winters-Stone, K., Lee, A., Schmitz, K. H. (2012). Cancer, physical activity, and exercise. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2775–2809. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120005>
- Campbell, S. C., Wisniewski, P. J., Noji, M., McGuinness, L. R., Häggblom, M. M., Lightfoot, S. A., Joseph, L. B., Kerkhof, L. J. (2016). The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice. *PloS one*, 11(3), e0150502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150502>
- Carini, F., Mazzola, M., Rappa, F., Jurjus, A., Geagea, A. G., Al Kattar, S., Bou-Assi, T., Jurjus, R., Damiani, P., Leone, A. & Tomasello, G. (2017). Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer research*, 37(9), 4759–4766. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11882>
- Cheetham, S., Tang, M. J., Mesak, F., Kennecke, H., Owen, D., & Tai, I. T. (2008). SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *British journal of cancer*, 98(11), 1810–1819. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604377>
- Chen, J., Pitmon, E., Wang, K. (2017). Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Seminars in immunology*, 32, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.006>
- Colbert, L. H., Davis, J. M., Essig, D. A., Ghaffar, A., Mayer, E. P. (2000). Exercise and tumor development in a mouse predisposed to multiple intestinal adenomas. *Medicine and science in sports and exercise*, 32(10), 1704–1708. <https://doi.org/10.1097/00005768-200010000-00007>
- de Castro Cotti, G. C., de Souza Santos, F. P., Sebastianes, F. M., Habr-Gama, A., Seid, V. E., & de Martino, R. B. (2000). Genética do câncer colorretal. *Revista de Medicina*, 79(2-4), 65-72. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v79i2-4p65-72>
- Cossiolo, D. C., Costa, H. C. M., Fernandes, K. B. P., Laranjeira, L. L. S., Fernandes, M. T. P., Poli-Frederico, R. C. (2017). Polymorphism of the COX-2 gene and susceptibility to colon and rectal cancer. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 30(2), 114-117. <https://doi.org/10.1590/0102-6720201700020008>
- Da Silva, L. F. B. P., Bequer, R. C., de Azevedo Mell, F., Fagiani, M. D. A. B., Mendonça, A. K. M. S., de Resende, D. T., Rossi, R. C. (2020, April). Análise Morfológica Dos Processos Patológicos Gerais Em Ratos Obesos E Sua Relação Com O Exercício Físico. In *Colloquium Vitae*. ISSN: 1984-6436 (Vol. 12, No. 1, pp. 93-98). [DOI: 10.5747/cv.2020.v12.n1.v288](https://doi.org/10.5747/cv.2020.v12.n1.v288)
- De Castro, M., Ferreira, A., Busanello, G. L., da Silva, L., da Silveira Junior, M., Fiorin, F., Arrifano, G., Crespo-López, M. E., Barcelos, R. P., Cuevas, M. J., Bresciani, G., González-Gallego, J., Figuera, M. R., Royes, L. (2017). Previous physical exercise alters the hepatic profile of oxidative-inflammatory status and limits the secondary brain damage induced by severe traumatic brain injury in rats. *The Journal of physiology*, 595(17), 6023–6044. <https://doi.org/10.1113/JP273933>
- De Lima, K. G., Maio, R. (2012). Nutritional status, systemic inflammation and prognosis of patients with gastrointestinal cancer. *Nutricion hospitalaria*, 27(3), 707-714. [DOI:10.3305/nh.2012.27.3.5567](https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.3.5567)
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways

to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis*, 10, 9. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.78279>

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis*, 10, 9. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.78279>

Demarzo, M.M.P., Garcia, S.B.(2004). Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer Letters*, 216 (1), 31-34. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.06.002>

Demarzo, M. M. P., martins, L. V., fernandes, C. R., herrero, F. A., perez, S. E. A., turatti. A., garcia, S. B. (2008). Exercise Reduces Inflammation and Cell Proliferation in Rat Colon Carcinogenesis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 40 (4), 618-621. DOI: [10.1249/MSS.0b013e318163274d](https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318163274d)

DE-Souza, A., Costa-Casagrande, T. A. (2018). Animal Models For Colorectal Cancer. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD Brazilian archives of digestive surgery*, 31(2), e 1369. <https://doi.org/10.1590/0102-672020180001e1369>

Di Meo, S., Napolitano, G., & Venditti, P. (2019). Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 3024. <https://doi.org/10.3390/ijms20123024>

Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., & DuBois, R. N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4), 1183–1188. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90246-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90246-1)

Frajacomo, F. T., Kannen, V., Deminice, R., Geraldino, T. H., Pereira-da-Silva, G., Uyemura S. A., Jordão Júnior, A. A., Garcia, S. B. (2015). Aerobic training activates interleukin 10 for colon anticarcinogenic effects. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47(9), 1806-1813. <http://dx.doi.org/10.1249/MSS.0000000000000623>

Ferraresso, R. L. P. (2010). Study of the relationship between oxidative attack, antioxidant defense system and mitochondrial activity in rats submitted to an overtraining induction protocol on a treadmill Dissertation (master's degree) - State University of Campinas, Institute of Biology, Campinas, SP

Freire, P. P. (2020). Integration of transcriptome and microRNoma data to identify regulatory networks, mediators and biomarkers of cachexia associated with cancer. Thesis presented to the Biosciences Institute, Botucatu Campus, UNESP, to obtain of the title of Doctor in the Postgraduate Program in Biological Sciences

Fuku, N., Ochiai, M., Terada, S.,Fujimoto, E.,Nakagama, H., Tabata,.I.(2007). Effect of Running Training on DMH-Induced Aberrant Crypt Foci in Rat Colon. *Medicine e Science in Sports & Exercise*,39(1),70-74. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0329>

Galle, F. A., Martella, D., & Bresciani, G. (2018).Antioxidant and anti-inflammatory modulation of exercise during aging. *Revista espanola de geriatria y gerontologia*, 53(5), 279-284. DOI: [10.1016/j.regg.2018.03.003](https://doi.org/10.1016/j.regg.2018.03.003)

Gochman, E., Mahajna, J., Shenzer, P., Dahan, A., Blatt, A., Elyakim, R., Reznick, A. Z. (2012). The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Actahistochemica*, 114(8), 827-835.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.02.004>

Gupta, A. K., Pretlow, T. P., Schoen, R. E. (2007). Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 5(5), 526–533.

<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.02.014>

Harriss, D. J., Cable, N. T., George, K., Reilly, T., Renehan, A. G., Haboubi, N. (2007). Physical activity before and after diagnosis of colorectal cancer. *Sports medicine*, 37(11), 947-960.

<https://doi.org/10.2165/00007256-200737110-00003>

Hart, P. C., Mao, M., de Abreu, A. L., Ansenberger-Fricano, K., Ekoue, D. N., Ganini, D., Kajdacsy-Balla, A., Diamond, A. M., Minshall, R. D., Consolaro, M. E., Santos, J. H., Bonini, M. G. (2015). MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nature communications*, 6, 6053.

<https://doi.org/10.1038/ncomms7053>

Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., de Vries, R. B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., Langendam, M. W. (2014). SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC medical research methodology*, 14, 43.

<https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>

Johnson, R. L., Fleet, J. C. (2013). Animal models of colorectal cancer. *Cancer metastasis reviews*, 32(1-2), 39–61.

<https://doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6>

Jucá, Mario Jorge, Bandeira, Bruno Carneiro, Carvalho, Davi Silva, Leal, Antenor Teixeira. (2014). Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)*, 34(3), 167-173.

<https://doi.org/10.1016/j.jcol.2014.06.003>

Kaori, M., koji, S., Ken, S., Eri, M. M., Noriyuki, F., kazuhiko, H., katsunori, T., Yuzhong, X., xin, L., motoyuki, I., takafumi, H. Izumi, T., (2017). A Mechanism Underlying Preventive Effect of High-Intensity Training on Colon Cancer. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 49 (9), 1805-1816. doi: 10.1249/MSS. DOI: [10.1249/mss.0000000000001312](https://doi.org/10.1249/mss.0000000000001312)

Kelly, S., Zhao, L., Jung, K., Chen Jung, K., Hua, K., Threadgill, D. W., Kim, Y., Villena, F. P. M., Pomp, D. (2017). Prevention of tumorigenesis in mice by exercise is dependent on strain background and timing relative to carcinogen exposure. *Sci Rep* 7, 43086.

<https://doi.org/10.1038/srep43086>

Koelwyn, G. J., Quail, D. F., Zhang, X., White, R. M., Jones, L. W. (2017). Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 17(10), 620–632.

<https://doi.org/10.1038/nrc.2017.78>

Koelwyn, G. J., Wennerberg, E., Demaria, S., Jones, L. W. (2015). Exercise in Regulation of Inflammation-Immune Axis Function in Cancer Initiation and Progression. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(12), 908–922.

- Lee, Y. Y., Yang, Y. P., Huang, P. I., Li, W. C., Huang, M. C., Kao, C. L., Chen, M. T. (2015). Exercise suppresses COX-2 pro-inflammatory pathway in vestibular migraine. *Brain research bulletin*, 116, 98-105. DOI: [10.1016/j.brainresbull.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.06.005)
- Lira, C. A. B. D., Vancini, R. L., Silva, A. C. D., Nouailhetas, V. L. A. (2008). Efeitos do exercício físico sobre o trato gastrointestinal. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14(1), 64-67. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922008000100012>
- Liu, B., Saber, A., Haisma, H. J. (2019). CRISPR/Cas9: a powerful tool for identification of new targets for cancer treatment. *Drug discovery today*, 24(4), 955-970. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.02.011>
- Liu, J., Long, S., Wang, H., Liu, N., Zhang, C., Zhang, L., Zhang, Y. (2019). Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth. *Cancer cell international*, 19, 336. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1054-0>
- Lucas, C., Barnich, N., Nguyen, H. T. T. (2017). Microbiota, inflammation and colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1310. <https://doi.org/10.3390/ijms18061310>
- Lunz, W., Peluzio, M. C. G., Dias, C. M. G. C., Moreira, A. P. B., Natali, A.J. (2008). Long-term aerobic swimming training by rats reduces the number of aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(11), 1000-1004. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008001100009>
- Lunz, W., Moreira, A. P. B., Viana, E. C. (2006). Mecanismos de proteção contra o câncer colorretal pelo exercício e atividade física. *Revista Digital Efdeportes*, 11, 102.
- Melouane, A., Carbonell, A., Yoshioka, M., Puymirat, J., St-Amand, J. (2018). Implication of SPARC in the modulation of the extracellular matrix and mitochondrial function in muscle cells. *PloSone*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192714>
- Neves, M. B., Gonçalves, A. F. & Ramalho, R. T. (2020). Ação Do Exercício Físico Sobre O Câncer Cólon: Revisão Sistemática. *Fiep Bulletin*, 90 (1). [doi:10.16887/90.a1.24](https://doi.org/10.16887/90.a1.24)
- Nieman, D. C., Wentz, L. M. (2019). The compelling link between physical activity and the body's defense system. *Journal of sport and health science*, 8(3), 201–217. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2018.09.009>
- Nilsson, M. I., Bourgeois, J. M., Nederveen, J. P., Leite, M. R., Hettinga, B. P., Bujak, A. L., May, L., Lin, E., Crozier, M., Rusiecki, D. R., Moffatt, C., Azzopardi, P., Young, J., Yang, Y., Nguyen, J., Adler, E., Lan, L. Tarnopolsky, M. A. (2019). Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. *PloS one*, 14(1), e0210863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210863>
- Pantaleão, C. Luchs, A. (2010). Cancer and experimental models of mouse tumor. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 69(4), 439-445.
- Pedersen, B. K. (2009). The diseasome of physical inactivity—and the role of myokines in muscle–fat cross talk. *The Journal of physiology*, 587(23), 5559-5568. Doi: [10.1113/jphysiol.2009.179515](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179515)

- Pedersen, L., Christensen, J. F., Hojman, P. (2015). Effects of exercise on tumor physiology and metabolism. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 21(2), 111–116.
<https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000096>
- Pingitore, A., Lima, G. P. P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., Vassalle, C. (2015). Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*, 31(7-8), 916-922. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.02.005>
- Qian, B. Z. Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Rosa, C., Bicudo, L. F. P. Vaisberg, M. W. (2002). Influências do exercício na resposta imune. *Revista brasileira de Medicina do Esporte*, 8(4), 167-172.
- Rudy, D. R. Zdon, M. J. (2000). Update on colorectal cancer. *American family physician*, 61(6), 1759-1770.
- Ruiz-Casado, A., Martín-Ruiz, A., Pérez, L. M., Provencio, M., Fiuza-Luces, C. Lucia, A. (2017). Exercise and the hallmarks of cancer. *Trends in cancer*, 3(6), 423-441.
DOI: [10.1016/j.trecan.2017.04.007](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.007)
- Silva, M. F., Sivieri, K., & Rossi, E. A. (2009). Effects of a probiotic soy product and physical exercise on formation of pre-neoplastic lesions in rat colons in a short-term model of carcinogenic. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 6(1), 17.
- Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*, 11, 967. DOI: [10.2147/CIA.S109285](https://doi.org/10.2147/CIA.S109285)
- SOUZA, Walysson Alves Tocantins de. Immunohistochemical analysis of the expression of p53 and ki-67 proteins in colorectal adenomas. 2010. 64 f. Dissertation (Master in Surgery) - Federal University of Ceará. Faculty of Medicine, Fortaleza, 2010.
- Spinola, A. V., de Souza Manzzo, I., da Rocha, C. M. (2007). As relações entre exercício físico e atividade física e o câncer. *ConScientiae Saúde*, 6(1), 39-48.
- Thaker, A. I., Shaker, A., Rao, M. S., Ciorba, M. A. (2012). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *Journal of visualized experiments:JoVE*, (67), 4100. Doi: [10.3791/4100](https://doi.org/10.3791/4100)
- Thorling, E. B., Jacobsen, N. O., Overvad, K. (1993). Azoxymethane, body composition, carcinogenesis, exercise, Fischer rats, intestinal cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 77-82.
- Wang, B., Chen, K., Xu, W., Chen, D., Tang, W., Xia, T. (2014). Integrative genomic analyses of secreted protein acidic and rich in cysteine and its role in cancer prediction. *Molecular Medicine Reports*, 10, 1461-1468. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2339>
- Wataru, A., Yuji, N., Tomohisa, T., Satoshi, K., Katsura, M., Yoshikazu, T., Yukari, K., Yuko, T., Liu, P. H., Ryota, K., Hiroshi, I., Toshikaz, Y. (2010). Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(1), 14-19.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.023>

Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P. R. Büchler, M.W. (2005). Colorectal cancer. *Lancet* (Londres, Inglaterra), 365 (9454), 153-165.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17706-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17706-X)

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Technical report: pricing of cancer medicines and its impacts: a comprehensive technical report for the World Health Assembly Resolution 70.12: operative paragraph 2.9 on pricing approaches and their impacts on availability and affordability of medicines for the prevention and treatment of cancer. 2018.

Yu, F. X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y. Guan, K. L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes & development*, 27(11), 1223-1232. DOI: [10.1101/gad.219402.113](https://doi.org/10.1101/gad.219402.113)