UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCELO MARCOS PIVA DEMARZO

**Efeitos da Atividade Física em Marcadores Biológicos da
Carcinogênese Química do Cólon de Ratos Wistar**

Ribeirão Preto

2005

MARCELO MARCOS PIVA DEMARZO

**Efeitos da Atividade Física em Marcadores Biológicos da
Carcinogênese Química do Cólon de Ratos Wistar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto

2005

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Demarzo, Marcelo Marcos Piva
Efeitos da Atividade Física em Marcadores Biológicos da Carcinogênese
Química do Cólon de Ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2005.
110p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Patologia
Experimental.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto

1. Câncer de cólon - Carcinogênese química em ratos, proliferação celular epitelial, focos de criptas aberrantes e criptas com acúmulo de beta-cateninas. 2. Atividade física: treinamento crônico e exercício exaustivo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Marcos Piva Demarzo
Efeitos da Atividade Física em
Marcadores Biológicos da
Carcinogênese Química do Cólon de
Ratos Wistar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor.
Área de concentração: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais e avós;
Aos meus irmãos e irmã;
A toda minha família;
Aos grandes amigos;
A presença constante de Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia, mente brilhante e professor incansável, que me apresentou ao método científico (e ao raciocínio lógico, criativo e intuitivo), desde os primeiros passos da graduação, e, acima de tudo, direcionou-me nos caminhos éticos que devem balizar o trabalho do médico e do cientista.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto, que catalisou e influenciou positivamente toda minha vida científica dentro dessa Instituição.

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez e equipe, que me acolheram e abriram as portas do Laboratório de Neurofisiologia e Fisiologia do Exercício Experimental, possibilitando, de forma decisiva, a realização dessa tese.

Ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior e equipe, que também me acolheram em seu Laboratório, e possibilitaram novos parâmetros de análise para esse estudo.

Ao Prof. Dr. Lourenço Gallo Júnior, pela fundamental contribuição à Medicina da Atividade Física dentro da FMRP-USP, e pelo incentivo ao meu trabalho nessa área.

Ao Prof. Dr. Hélio Vannucchi, pelas valiosas contribuições na discussão dessa tese.

Ao Prof. Marcos Aurélio Demarzo, pela valiosa revisão da forma.

À Rosângela Orlandin Lopes e Patrícia Modiano pela amizade e pela presença e ajuda fundamentais em todos os momentos dessa tese.

À Neide Terezinha Gonçalves, pela amizade, paciência e auxílio durante todo o período da pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Oncopatologia, Aline, Suziane, Flávia, Luane, Marcelo, Cleverson, Maíra, Fábio, e tantos outros, que sempre se dispuseram a ajudar e a apoiar meu trabalho.

À Alessandra Crescenzi, do Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo (ICB-USP), que teve participação fundamental logo no início desse trabalho.

À gloriosa Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, à Associação Atlética Acadêmica Rocha Lima e seu Núcleo de Medicina Esportiva (NUMESP), pelo ambiente familiar e profícuo de incentivo ao estudo e à ação dentro da Medicina, principalmente dentro da Medicina da Atividade Física.

Ao grande amigo Sérgio, que, além de professor e orientador, sempre me fortaleceu e incentivou com sua amizade e palavras de apoio em vários momentos críticos e fundamentais de minha vida pessoal e profissional.

À amiga Eleonora, cuja ajuda e disponibilidade foram imprescindíveis para a finalização desse trabalho.

Às corridas ao redor do lago da USP, que trouxeram inspiração e idéias fundamentais para esse trabalho.

Ao amor de meus pais e de minha família, que nunca mediram esforços para facilitar meus caminhos.

À Natureza e à Deus, que dão sentido a minha existência e ao meu trabalho.

“Se tudo o que é conhecido hoje sobre a prevenção do câncer fosse aplicado, cerca de dois terços dos tumores não ocorreriam”.

(American Cancer Society, 1996)

RESUMO

Demarzo, M.M.P. Efeitos da Atividade Física em Marcadores Biológicos da Carcinogênese Química do Cólon de Ratos Wistar. 2005. 110 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2005.

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando que quantidades apropriadas de atividade física regular estão associadas a significativa redução do risco para o desenvolvimento de câncer de cólon em até 40% entre os indivíduos mais fisicamente ativos. Por outro lado, tem sido observado que o exercício físico exaustivo aumenta a produção sistêmica de radicais livres, com concomitante aumento dos danos oxidativos ao DNA, além de deprimir a função imune global, eventos relacionados ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer. Relativamente, poucos estudos experimentais exploram essas relações, principalmente no que concerne ao exercício exaustivo e o câncer. A taxa de proliferação celular epitelial, os focos de criptas aberrantes (FCAs) e as criptas com acúmulo de beta-catenina (CABC) têm sido marcadores biológicos (biomarcadores) usados para a identificação precoce de fatores que poderiam influenciar a carcinogênese colônica em ratos. Através da aplicação do carcinógeno químico 1,2dimetilhidrazina (DMH), logo após os protocolos de exercício, foram estudados quatro grupos principais de ratos previamente sedentários (grupo-controle, e três grupos submetidos, respectivamente, ao treinamento crônico de natação, à natação até a exaustão, e à natação até a exaustão após treinamento crônico), sendo sacrificados quinze dias após a injeção da DMH. Após análise histológica e imunohistoquímica, os biomarcadores

estudados mostraram resultados coerentes nas diferentes situações experimentais aferidas. Foi observada uma diminuição estatisticamente significativa da resposta hiperproliferativa, do número de FCAs e de CABC no grupo que realizou o treinamento crônico, enquanto o grupo submetido ao exercício exaustivo apresentou aumento estatisticamente significativo dos parâmetros citados, quando comparados ao grupo-controle. No grupo submetido à associação dos dois protocolos de exercício, quando comparado ao grupo-controle, não houve alterações significantes nos biomarcadores de transformação neoplásica estudados. Nesse estudo experimental, o treinamento físico crônico teve efeito protetor contra o desenvolvimento dos biomarcadores precoces de transformação neoplásica do cólon, enquanto o exercício físico exaustivo aumentou a prevalência destes em ratos sedentários. O treinamento físico crônico, quando associado ao exercício físico exaustivo, não alterou a prevalência dos biomarcadores estudados. Desse achado, acrescido do que se pode encontrar na literatura científica atual, levanta-se a hipótese de que, de maneira similar à relação entre exercício físico e infecções, também o exercício poderia ou proteger contra o desenvolvimento, ou aumentar o risco para o câncer, dependendo do tipo, intensidade e duração da atividade desenvolvida.

Palavras-chave: Câncer de cólon - Carcinogênese química em ratos, proliferação celular epitelial, focos de criptas aberrantes e criptas com acúmulo de beta-cateninas. Atividade física: treinamento crônico e exercício exaustivo.

ABSTRACT

Demarzo, M.M.P. Physical activity effects on chemical colon carcinogenesis biomarkers in rats. 2005. 110 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2005.

Epithelial cell proliferation, aberrant crypt foci (ACF) and β -catenin-accumulated crypts (BCAC) have been used for early detection of factors that influence colorectal carcinogenesis in rats. It has been observed that moderate and regular physical activity may prevent colon cancer up to 40% in humans. However, exhaustive exercise increases free radical DNA oxidative damage and depresses immune function, events also related to the increased risk for cancer development. Fifteen days after either a single exhaustive swimming bout or a swimming physical training for 8 weeks, or both, in untrained rats treated with a colon carcinogen, we observed a statistically significant decreased number of those biomarkers in rats under training protocol, and a statistically significant increased number of them in rats under exhaustive protocol, when compared to the non-exercised group. For the rats under exhaustive protocol after being trained, data was not evident. Thus, we concluded that training protected against the biomarkers development and exhaustive exercise improved colorectal carcinogenesis biomarkers development in sedentary rats. From our finding and literature data, we hypothesize that, similarly to the suggested relationship between exercise and infections, exercise could be protective against cancer or it could increase the risk for this disease depending on its type, dose and duration.

Keywords: Colon cancer – chemical colon carcinogenesis in rats; epithelial cell proliferation, aberrant crypt foci, β -catenin accumulated crypts. Physical activity – exhaustive exercise and training protocol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental e nomenclatura dos grupos.....	50
Figura 2 – Cripta com células marcadas para a presença de PCNA. Observa-se a presença de núcleos enegrecidos nos dois terços inferiores da cripta (setas), que correspondem às células com marcação positiva para PCNA.....	57
Figura 3 – Focos de Criptas Aberrantes (setas) em cólon de animal sedentário submetido à aplicação de DMH.....	61
Figura 4 – Criptas positivamente marcadas para a presença de acúmulo de beta-catenina (setas).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média do número de células marcadas positivamente pelo PCNA por cripta por animal, em relação à média do número total de células por cripta nos animais dos grupos I a VII.....	106
Tabela 2 – Índices médios de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) para cada animal dos grupos de I a VII.....	107
Tabela 3 – Índices médios de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA), e os respectivos desvios-padrões (SD), nos grupos de I a VII.....	108
Tabela 4 - Média do número de FCAs/cm ² por animal, e média do número de FCAs/cm ² e respectivos desvios-padrões por grupo, contados 30 campos microscópicos.....	109
Tabela 5 – Média do número de CABC em relação ao número total de criptas por animal, contados 30 campos microscópicos, e iCABC médios por grupo, e seus respectivos desvios-padrões.....	110

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação estatística entre os resultados dos sete grupos estudados em relação ao iPCNA médio por grupo, e respectivos desvios-padrões.....60

Gráfico 2 - Comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados, em relação ao número médio de FCAs/cm² por grupo, e respectivos desvios-padrões.....63

Gráfico 3 - Comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados em relação ao iPCNA médio por grupo, e respectivos desvios-padrões.....66

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

BC – Beta-catenina

CABC – Criptas com acúmulo de beta-catenina

DMH – 1,2-dimetilhidrazina

DNA – Ácido desoxiribonucléico

FCAs – Focos de criptas aberrantes

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen*

ROS – Espécies reativas do oxigênio

SD – Desvio-padrão

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	20
1.1 – O Câncer e a Atividade Física	20
2 – REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 – A Carcinogênese Colorretal	25
2.1.1 – Aspectos gerais	25
2.1.2 – Aspectos epidemiológicos	26
2.2. – O Câncer de Cólon e a Atividade Física	27
2.2.1 – Estudos epidemiológicos	28
2.2.2 – Estudos em modelos experimentais	29
2.2.2.1. Modelos experimentais de carcinogênese colônica	30
2.2.2.2 – Modelos experimentais de exercício físico	32
2.2.2.3. - Estudos experimentais de associação entre exercício físico e câncer	34
2.3 – Marcadores biológicos (biomarcadores) da carcinogênese colônica	38
2.3.1 – A proliferação celular epitelial	38
2.3.2 - Os focos de criptas aberrantes (FCAs)	39
2.3.3 - As criptas com acúmulo de beta-catenina (CABC)	42
2.4. – Hipóteses	46
3 - OBJETIVOS DO ESTUDO	47

4 - MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 – Animais	48
4.2 - Delineamento Experimental	48
4.3 - Preparo do Carcinógeno	50
4.3.1 - Segurança para a DMH	51
4.3.2 - Aplicação do Carcinógeno	51
4.4 - Coleta e processamento do cólon	51
4.5 – Avaliação dos biomarcadores da carcinogênese colônica	52
4.5.1 - Proliferação celular epitelial	52
4.5.2 – Focos de criptas aberrantes (FCAs)	54
4.5.3 – Criptas com acúmulo de beta-catenina (CABC)	54
4.6 - Análise estatística	55
5 – RESULTADOS	56
5.1 – A proliferação celular	56
5.2 - Contagem de FCAs	60
5.3 – Contagem das CABC	63
6 – DISCUSSÃO	67
6.1 – Possíveis mecanismos biológicos envolvidos	68
6.2 – Possíveis efeitos da atividade física na carcinogênese humana	73
7 – CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE	102
ANEXOS	106

1- INTRODUÇÃO

1.1 – O Câncer e a Atividade Física

Determinados comportamentos e hábitos de vida estão associados com o aumento da incidência de câncer no mundo: o uso do tabaco, o estilo de vida sedentário, o aumento da prevalência de indivíduos com sobrepeso e obesidade, o aumento da proporção de gorduras saturadas e açúcares simples na dieta, e as mudanças nos padrões reprodutivos (1).

Nos últimos 20 anos, o estilo de vida sedentário vem sendo associado com o aumento do risco para diversos tipos de câncer, especialmente para as neoplasias do cólon intestinal e das mamas. Além disso, o sobrepeso e a obesidade, em parte produtos do sedentarismo, também estão associados com o risco aumentado para os cânceres de cólon, mamas (em mulheres pós-menopausadas), endométrio, esôfago (adenocarcinomas), vesícula biliar, pâncreas e rins (1).

Por este motivo, a atividade física regular foi adicionada em 1996 à lista de medidas preventivas defendidas pela *American Cancer Society* (Sociedade Norte-americana de Câncer) (2). A mesma Sociedade estima que um terço das mortes causadas pelo câncer dentro dos Estados Unidos da América podem ser atribuídas ao sedentarismo e às dietas alimentares inadequadas. Estimativa parecida é defendida pela *International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization* (Agência Internacional para Pesquisa de Câncer da Organização Mundial da Saúde), que evidencia

a associação do excesso de peso corporal e da inatividade física com as neoplasias de mamas, cólon, endométrio, rins e adenocarcinomas de esôfago. Ambas as entidades recomendam a prática de atividades físicas na maioria dos dias da semana, de moderada intensidade, prevenindo o sobrepeso e a obesidade, e também vários tipos de neoplasias (1).

A idéia de que a atividade física poderia ser importante na prevenção do câncer não é recente. Os primeiros trabalhos datam de 1922 (3, 139), os quais compararam a taxa de mortalidade por câncer com a quantidade de atividade física ocupacional, observando um decréscimo nesta taxa quanto maior era o nível exigido de atividade física na ocupação laboral. O tema foi novamente estudado em 1945 por POTTER et al. (4), que apontaram a diminuição da ingesta calórica e o aumento nos níveis de atividade física como possíveis fatores de proteção contra o câncer. Esses autores evidenciaram a atividade física como um fator independente de proteção, sendo efetiva mesmo quando se isolavam os fatores Índice de Massa Corporal (IMC) e dieta.

Os estudos sobre câncer e atividade física pouco se desenvolveram até a década de 70 do século passado, quando se iniciou uma proliferação de estudos e publicações sobre o tema. Novas pesquisas indicaram claramente uma associação entre a quantidade de atividade física individual e os riscos para o desenvolvimento de câncer, sendo essa associação específica para diversos tipos de neoplasias (5).

Grandes estudos epidemiológicos vêm demonstrando que quantidades apropriadas e regulares de atividade física estão associadas a uma significativa redução do risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. A evidência é mais consistente para o câncer de cólon, cuja incidência pode ser reduzida em até 40% entre os indivíduos mais ativos, comparados com os menos ativos. Os efeitos independem do gênero e de possíveis fatores de confundimento, tais como a obesidade e o tipo de dieta (6-9, 154).

Recentemente um *workshop* avaliou os conhecimentos científicos atuais sobre o papel da atividade física na prevenção do câncer. Concluiu-se que as evidências são convincentes para a proteção específica contra o câncer de cólon intestinal, prováveis para o câncer de mama, possíveis para o câncer de próstata e insuficientes para outros tipos de neoplasias. Recomendou-se que futuras investigações sobre o assunto abordassem todos os possíveis fatores envolvidos nessa relação, principalmente os mecanismos biológicos, ainda muito pouco entendidos (6).

THUNE, em 2000 (4), pontuou algumas dificuldades para o estudo da relação entre o câncer e a atividade física, entre elas: geralmente as pessoas sedentárias têm outros fatores de risco, tais como obesidade e dieta inadequada; diversos estudos se baseiam em informações incompletas obtidas por questionários retrospectivos; e a existência de relativamente pouco conhecimento sobre a patogênese do câncer e de como ela poderia se relacionar com a prática de atividade física. Concluiu que são necessários estudos epidemiológicos mais precisos e ainda um maior entendimento sobre

os mecanismos do processo carcinogênico e sua relação com a atividade física.

Além do aspecto da proteção específica contra determinados tipos de câncer, a atividade física também vem sendo estudada como terapia adjuvante no tratamento de pacientes portadores de neoplasias. THUNE, em 2000 (4), analisou trinta e oito trabalhos sobre portadores de câncer e concluiu que a atividade física melhora a qualidade de vida desses pacientes, diminuindo também a fadiga e a depressão. Outro autor mostrou que uma das principais causas de depressão em pacientes com câncer de mama é a restrição (voluntária ou involuntária) de suas atividades físicas habituais (10). Não há, entretanto, informações consistentes que relacionem a prática de atividades físicas e o aumento da sobrevida nestes pacientes (4).

Uma questão ainda pouco estudada na relação entre o câncer e a atividade física é o fato de que, apesar da atividade física praticada de forma regular e moderada estar associada a uma infinidade de benefícios para a saúde em geral da população (11-13), o exercício físico realizado de forma exaustiva aumenta a produção e os danos oxidativos gerados pelos radicais livres, inclusive na estrutura do Ácido desoxirribonucléico (DNA) (11, 14-17), além de causar depressão da função imune global (18-21). Ambos os efeitos maléficos apresentados têm sido associados ao risco aumentado para o desenvolvimento de câncer. A associação entre câncer e a prática de exercício físico exaustivo por indivíduos sedentários, ou mesmo ativos, têm sido pouco discutida e estudada pela literatura científica internacional. Deve-se mencionar que esse tema foi abordado por COOPER, em 1994 (156),

que indagou se havia uma possível correlação entre o excesso de corridas e o câncer, após observar um elevado número de maratonistas e ultramaratonistas com diagnóstico de câncer em idades precoces.

Este trabalho se insere na linha de pesquisa que busca maiores elucidações sobre a relação entre o câncer e a atividade física, enfocando a questão sobre o câncer de cólon intestinal, através de um ensaio experimental de carcinogênese química em ratos Wistar.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – A Carcinogênese Colorretal

2.1.1 – Aspectos gerais

A carcinogênese é um processo complexo, provavelmente envolvendo uma plethora de eventos epigenéticos ocorrendo nos níveis morfológico, celular e molecular, podendo ser dividida em três estágios principais: iniciação, promoção e progressão (22, 23).

A transformação neoplásica da mucosa normal em um adenoma e, posteriormente, em um carcinoma invasor envolve uma série de alterações genéticas e eventos progressivos que são conhecidos como seqüência adenoma-carcinoma. A perturbação do equilíbrio fisiológico e cíclico da renovação tecidual e produção celular, passando pela diferenciação até sua morte (apoptose), resultam nas doenças neoplásicas do epitélio intestinal (24). O aumento da proliferação celular nas criptas colônicas tem sido considerado, em muitos estudos, o evento celular mais precoce da carcinogênese do cólon (25, 26).

Os avanços recentes da biologia molecular levaram a maior compreensão do complexo processo da carcinogênese colônica. Três teorias envolvendo mecanismos moleculares até a produção de um tumor têm sido estudadas: a seqüência adenoma-carcinoma, reparos defeituosos (*mismatch repair*) e carcinoma *de novo*.

O modelo da seqüência adenoma-carcinoma foi proposto em 1990 (27), e resultou da compreensão da função de proteínas reguladoras do ciclo celular (APC, K-ras, DCC e p53). Este modelo é aplicável à polipose familiar adenomatosa (FAP) e ao câncer esporádico, que é o mais freqüente. O modelo de reparos defeituosos é aplicável aos pacientes com câncer colorretal hereditário não polipóide (HNPCC) (28), os quais apresentam uma perda da função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA. O acúmulo de mutações genéticas desencadearia o processo carcinogênico. O modelo do carcinoma *de novo* (29) baseou-se no achado de lesões planas com elevado índice de malignização.

2.1.2 – Aspectos epidemiológicos

No mundo, os tumores malignos que acometem o cólon e o reto somam, a cada ano, cerca de 945 mil casos novos. O câncer de cólon e reto é o segundo mais prevalente no mundo, com uma estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas com diagnóstico nos últimos cinco anos. Nos países desenvolvidos a incidência de câncer de cólon e reto é maior do que nos países em desenvolvimento (30).

O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado de moderado a bom, quando detectado precocemente. A sobrevida média cumulativa em cinco anos é cerca de 40 a 50% e não é grande a diferença entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento: 49% (variando

entre 30 e 61%) e 44% (variando entre 33 e 45%), respectivamente. A média mundial estimada é de 44% (30).

O alto consumo de frutas, vegetais frescos, cereais, baixo consumo de carnes vermelhas e de bebidas alcoólicas, bem como a prática de atividade física, estão associados a um baixo risco para o desenvolvimento de câncer colorretal (30). No Brasil, resultados de Inquéritos Domiciliares apontaram que o percentual de indivíduos que referem consumir frutas, legumes e verduras cinco vezes ou mais por semana variou entre 51% e 81%. O percentual de indivíduos insuficientemente ativos variou entre 28% e 55%. A prevalência de excesso de peso (Índice de Massa Corporal maior que 25, IMC>25) variou entre 33% e 46% (30), mostrando que o sedentarismo e o sobrepeso ainda são desafios a serem transpassados, quando pensamos em prevenção do câncer colorretal.

2.2. – O Câncer de Cólon e a Atividade Física

Definições específicas são usadas nas aplicações da atividade física em estudos epidemiológicos para caracterizar os padrões comportamentais e suas conseqüências nos grupos que estão sendo investigados. Uma terminologia relevante inclui os seguintes termos: 1) atividade física: qualquer movimento corporal produzido por músculos e que resulta em dispêndio aumentado de energia, 2) exercício físico: atividade física planejada, estruturada, repetitiva e proposital, e 3) treinamento físico crônico: exercício físico com protocolo planejado quanto à frequência, duração e intensidade do

trabalho realizado (31). Nesse estudo essas terminologias e definições serão utilizadas tanto para os estudos epidemiológicos descritos, quanto nas descrições e análises dos estudos experimentais.

2.2.1 – Estudos epidemiológicos

Há forte evidência de que a atividade física reduz o risco para câncer de cólon intestinal em até 30-40% (32). Até o momento pelo menos 50 trabalhos científicos examinaram a associação entre atividade física e o risco para desenvolvimento desse tipo de câncer. A grande maioria dos trabalhos mostra claramente um padrão de menor risco entre os homens e mulheres mais fisicamente ativos. O risco relativo, em média, foi 0,7 para homens e 0,6 para mulheres, indicando um risco 30-40% menor quando comparados indivíduos mais ativos com os menos ativos. Os dados também indicaram que há um efeito dose-resposta, ou seja, o risco continua a declinar quanto maior a quantidade de atividade física praticada pelo indivíduo (32).

Apesar de haver clareza na associação entre atividade física e o menor risco de desenvolvimento do câncer de cólon intestinal, ainda são pouco claros os detalhes dessa relação (5). Os mecanismos envolvidos são pouco compreendidos, postulando-se alguns possíveis como: diminuição do fluxo sanguíneo gastrointestinal, alterações neuro-endócrinas e aumento da motilidade intestinal (32).

Poucos estudos têm examinado assuntos específicos como a quantidade, a intensidade e a duração da atividade física requerida (5).

Apesar dos dados ainda esparsos, recomenda-se que 30-60 minutos diários de atividade física moderada a vigorosa são suficientes para diminuir o risco para câncer de cólon intestinal entre homens e mulheres (5).

Com pelos 30 estudos examinando a relação entre o risco para câncer retal e os níveis individuais de atividade física, com resultados variando desde uma redução de 70% até um aumento na incidência de 150%; em geral, não se mostrou nenhuma associação entre os níveis de atividade física de uma pessoa e seu risco para desenvolvimento de câncer retal, com um risco relativo médio de 1,0 (5), dados que explicam o fato desse presente estudo enfocar apenas o câncer de cólon.

2.2.2 – Estudos em modelos experimentais

Os modelos experimentais são importantes para o estudo da relação entre a atividade física e o câncer, devido ao fato dos estudos epidemiológicos não proverem informação detalhada sobre as fases de iniciação, promoção e progressão do câncer em relação à exposição à atividade física (33).

2.2.2.1. Modelos experimentais de carcinogênese colônica

Os modelos de animais geneticamente modificados, que poderiam focar os experimentos no nível de interação gene-ambiente celular (epigenético), ainda têm sido pouco utilizados nos estudos de câncer e exercício. Tais modelos animais poderiam contribuir para o entendimento da influência do exercício sobre o desenvolvimento do câncer em indivíduos geneticamente predispostos, como também o conhecimento sobre os estágios tardios da carcinogênese em indivíduos que desenvolveram mutações somáticas (35).

Os modelos de camundongos singênicos envolvendo transplante de células tumorais, especialmente os transplantes ortópicos, são úteis para as respostas às questões sobre o impacto do exercício sobre as metástases. Os transplantes ortópicos poderiam ser mais relevantes se células tumorais humanas fossem utilizadas. Animais imunodeficientes também poderiam ser apropriados para o estudo das metástases tumorais em relação a diferentes protocolos de exercício (33).

Os carcinógenos químicos são classificados conforme sua ação: direta (por exemplo, a N-metil-N-nitrosouréia ou NMU) ou indireta (por exemplo, a dimetilhidrazina ou DMH). Os carcinógenos químicos estimulam a proliferação celular e induzem a formação de tumores numa variedade de órgãos e tecidos, dependendo da via de administração, tempo de administração, dose, duração e frequência da administração, e sexo do animal (34).

A especificidade química do carcinógeno também afeta o tipo de tumor que irá se desenvolver (35), sendo que a idade, o sexo e a linhagem do animal também irão influenciar o tipo de tumor que será induzido. Um fator bastante questionado nos estudos envolvendo carcinógenos químicos é que os efeitos genotóxicos obtidos são dependentes de altas doses de carcinógeno, em contraposição às baixas doses de exposição encontradas em humanos.

Um protocolo para se estudar a carcinogênese química do cólon depende de diversas variáveis: 1) em relação ao modelo animal utilizado (espécie, linhagem, sexo, isogenicidade, acondicionamento ambiental, dieta e idade), 2) em relação ao carcinógeno escolhido (tipo, mecanismo de ação, metabolismo e forma de administração), e 3) em relação ao efeito do carcinógeno (formação de diferentes tipos de tumores, método de monitorização dos tumores e período de observação em relação à expectativa de vida do animal) (36).

O câncer de cólon intestinal pode ser induzido em modelos experimentais, utilizando-se diversos carcinógenos químicos, como por exemplo, a 1,2-dimetilhidrazina (DMH), um carcinógeno de ação indireta, que possui um alto grau de especificidade para o cólon de variadas espécies de roedores (37-41). Este modelo têm sido de grande importância em estudos sobre diversos aspectos da morfologia e patogênese da doença, contribuindo para o aperfeiçoamento do seu diagnóstico, prevenção e tratamento (37-41).

A DMH tem sido o carcinógeno colônico mais utilizado em estudos experimentais em razão de sua estabilidade química e alta taxa de obtenção

de tumores em um pequeno período de latência. Isto pode ser conseguido com uma única injeção de DMH ou com uma série semanal de injeções, desde que a dose total da droga injetada seja equivalente. O período de latência depende do tipo de lesão que se quer obter e da via de administração. A administração da DMH em ratos produz metabólitos ativos, os quais promovem a metilação do DNA das células epiteliais colônicas; substituição do grupo metil pelo grupo etil, gerando tumores depois de um certo período de latência (35, 42).

2.2.2.2 – Modelos experimentais de exercício físico

Diferenças de resultados nos estudos experimentais sobre exercício físico e tumores de cólon intestinal podem refletir diferenças na seleção do tipo e do protocolo de exercício utilizado. Em relação aos protocolos de treinamento forçado ou protocolar, diferenças na intensidade e duração do exercício, e no momento de prática do exercício em relação à exposição ao carcinógeno contribuem para a variabilidade nos resultados encontrados (43, 44).

Outros fatores a serem considerados na interpretação desses estudos incluem efeitos do ambiente de estudo, falhas ao se colocar os animais para se exercitarem, pré-seleção de mais propensos ao exercício, efeitos provenientes de lesões durante a prática do exercício, e a influência de

ambientes previamente favoráveis à prática de exercício (especialmente as gaiolas com rodas que permitem a corrida espontânea dos animais) (43, 44).

Uma importante consideração a se fazer quando da análise e interpretação do impacto de um modelo experimental de exercício sobre o crescimento tumoral é o estresse proveniente das atividades físicas forçadas ou protocolares. Respostas psicofisiológicas ao estresse podem ser fatores de confundimento quando da análise das respostas fisiológicas ao exercício regular e forçado. Exercícios voluntários ou espontâneos (por exemplo, o acesso livre a rodas para corrida dentro das gaiolas) são provavelmente um melhor modelo para se identificar as adaptações secundárias ao treinamento físico em animais portadores de tumores, devido ao fato do exercício espontâneo ou voluntário não resultar numa sustentada produção de corticosteróides como resposta ao estresse provocado pelo exercício (45).

Modelos experimentais de natação também têm sido utilizados para o estudo do crescimento de tumores em roedores (46). Efeitos como hipotermia, flutuabilidade em relação à composição corporal, limitação para a mensuração dos efeitos relativos à intensidade do exercício (apenas a duração e a frequência variam geralmente) precisam ser considerados na interpretação dos resultados provenientes de modelos experimentais que utilizam a natação para o estudo da relação entre câncer e atividade física.

Outras espécies animais também poderiam ser utilizadas nos estudos sobre câncer e exercício, como por exemplo, as cobaias, que são um bom modelo para o estudo da carcinogênese prostática (47); mas, geralmente, ratos e camundongos têm sido os modelos de escolha para as investigações

sobre câncer e atividade física. Há diversas razões para esse fato: 1) as patologias neoplásicas (por exemplo, cólon e glândulas mamárias) desses roedores têm sido exaustivamente caracterizadas (48, 49); 2) as respostas metabólicas, cardiovasculares e da musculatura esquelética ao exercício experimental têm sido extensivamente documentadas por décadas (50, 51); e 3) a farmacocinética dos carcinógenos químicos têm sido bastante estudada nesses animais (52, 48).

2.2.2.3. Estudos experimentais de associação entre exercício físico e câncer

Os modelos animais de atividade física e câncer permitem o refinamento das hipóteses levantadas a partir dos estudos populacionais, e a identificação de vias e mecanismos biológicos envolvidos nessa relação. O uso de modelos animais para estudar se a atividade física ou o exercício físico reduzem ou atrasam a instalação e a progressão do câncer e de suas metástases não é uma novidade. Os primeiros estudos com ratos utilizaram modelos experimentais com altas cargas de exercício ou altas doses de inoculação de células tumorais (53-55). Embora esses estudos mostrem que o exercício protegeu contra o crescimento tumoral, a natureza severa dos protocolos de exercício levantou questionamentos sobre a validade e a generalização dos achados. Em muitos casos, os aparentes efeitos protetores relacionados ao exercício poderiam refletir fatores de confundimento, tais como a restrição calórica e as condições de acondicionamento dos animais.

Existe uma substancial literatura sobre a epidemiologia da relação entre atividade física e os tumores de cólon. Porém, há muito poucos estudos experimentais que estudam essa relação (5), sendo que os resultados derivados desses estudos nem sempre são consistentes para especificar a melhor maneira ou intensidade de praticar a atividade física para obtenção de efeitos benéficos sobre o desenvolvimento dos tumores. Essa variabilidade reflete as diferenças entre os modelos animais e os protocolos de exercício utilizados, como também em relação aos modelos de tumores estudados. Embora uma grande variedade de espécies tenha sido utilizada nos estudos experimentais do câncer, ratos e camundongos têm sido os modelos de escolha nos estudos sobre a relação entre câncer e exercício (33).

Idealmente, um modelo animal selecionado para se estudar a associação entre câncer e atividade física deveria ser relevante para o entendimento do câncer humano em termos de carcinogênese (etiologia, progressão, e metástases) e características biológicas (morfologia, bioquímica, lesões e mecanismos biomoleculares) (56). A exposição aos carcinógenos químicos que induzem os tumores de cólon em roedores envolvem doses e exposição temporal que freqüentemente difere do processo carcinogênico em humanos. A exposição de ratos e camundongos ao carcinógeno geralmente continua até o aparecimento histológico ou morfológico dos tumores, o que torna o conhecimento sobre os mecanismos da carcinogênese incompleto (22). Apesar disso, a carcinogênese química é considerado um bom modelo para o estudo da influência da atividade física durante o período pós-iniciação.

Carcinógenos químicos têm sido empregados em modelos animais para o estudo da prevenção do câncer de cólon pela atividade física. Um estudo freqüentemente citado é o de ANDRIANOPOULOS et al., em 1987 (57), que injetou intraperitonealmente 20 mg/Kg de DMH em ratos *Sprague Dawley*, semanalmente por 6 semanas. Os ratos foram divididos em 2 grupos: um com acesso a rodas para atividade física espontânea, e um sem acesso (grupo-controle). O número total de tumores (colônicos e extra-colônicos) foi significativamente menor ($P = 0.06$) e com incidência significativamente menor ($P < 0.05$) no grupo fisicamente ativo. A duração da permanência na roda livre não foi especificada pelo estudo. REDDY et al., em 1988 (58), mostraram significantes reduções na incidência e multiplicidade dos adenocarcinomas do cólon e intestino delgado em ratos “F344” expostos ao exercício espontâneo em gaiolas com rodas livres por 38 semanas, e submetidos a injeções subcutâneas de 15 mg/Kg de Azoximetano (AOM) semanalmente por 2 semanas no início do protocolo. Estudos realizados por THORLING et al., em 1994 (59), indicaram significativa redução ($P < 0.001$) na incidência de carcinomas colônicos induzidos por AOM (15 mg/kg, 3 doses) em ratos sedentários, alimentados com óleo de milho e submetidos ao treinamento em esteira adaptada (2 km/dia, 7 m/min, 5 vezes por semana, por 38 semanas). A via de administração não foi especificada.

Embora esses estudos apontem para um efeito protetor da atividade física sobre a incidência de tumores colônicos induzidos por carcinógenos químicos em roedores, a magnitude da proteção ou a redução relativa do risco variou. As diferenças podem ser em parte explicadas pelo uso de

carcinógenos de ação direta (AOM) e de ação indireta (DMH), este último necessitando ser metabolizado no fígado para se tornar ativo metabolicamente. A via de administração também contribui para a variação nos resultados. Por exemplo, uma dose via oral pode resultar numa baixa incidência de tumores de cólon (60), enquanto as doses subcutâneas podem levar a altas incidências (61). Também não surpreende o fato do tempo de latência para o aparecimento do tumor variar conforme a dose utilizada. Uma alta incidência de tumores, com um pequeno período de latência, ocorre com a exposição a altas doses de carcinógeno (62, 63).

Outras variáveis experimentais, por exemplo, o tipo de dieta (pobre ou rica em gorduras), também limitam a comparabilidade entre os modelos experimentais empregados nos estudos envolvendo câncer e atividade física. A seleção de animais conforme a performance inicial de corrida também pode gerar um viés na análise dos resultados encontrados (33).

Conforme citado anteriormente, alguns estudos experimentais analisaram a relação entre a atividade física e o câncer de cólon (57, 58, 59, 115), porém nenhum até o momento estudou o tema em relação às fases mais precoces da carcinogênese; com a exceção de um trabalho recente, que estudou esse aspecto em relação ao exercício exaustivo (116).

2.3 – Marcadores biológicos (biomarcadores) da carcinogênese colônica

2.3.1 – A proliferação celular epitelial

Embora ainda permaneçam desconhecidos muito dos eventos que acontecem entre o aumento da população celular das criptas e o aparecimento do câncer, já é bem estabelecido em humanos que a proliferação celular da mucosa colônica está aumentada em indivíduos com alto risco para câncer, e, freqüentemente, se manifesta através da projeção do compartimento proliferativo das criptas em direção à luz do tubo gastrointestinal (41).

Em modelos experimentais de carcinogênese do cólon, verificou-se que a DMH acarreta aumento na proliferação celular do cólon, com: a) aumento do número total de células por cripta; b) aumento do número de células marcadas por timidina; c) aumento do índice mitótico (razão entre o número de células marcadas e o número total de células) nas criptas (41). Desta forma, acredita-se que pólipos adenomatosos e carcinomas são processos patológicos progressivos que acontecem como consequência da administração de DMH e sucedem as alterações de proliferação celular. Assim, as alterações morfocinéticas epiteliais em resposta à DMH seriam marcadores precoces da transformação neoplásica nestas situações (64).

Os ensaios que verificam a resposta proliferativa epitelial precoce em resposta à aplicação de DMH têm se configurado como adequados para se testar o potencial de aumentar ou diminuir o risco para o câncer em diversas

situações experimentais. Assim, por exemplo, verificam-se que fatores dietéticos que diminuem o risco para o desenvolvimento do câncer de cólon também reduzem a resposta hiperproliferativa da mucosa à ação de carcinógenos químicos, o que mostra que estes fatores atuam em etapa precoce da transformação neoplásica (65). Desta forma, o estudo da resposta proliferativa epitelial à DMH, em cólon de ratos submetidos à atividade física experimental, poderia fornecer importantes subsídios para a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa relação.

2.3.2 - Os focos de criptas aberrantes (FCAs)

Os focos de criptas aberrantes (FCAs), inicialmente descritos por BIRD em 1987 (66), são encontrados no cólon de ratos tratados com a DMH, de forma dose-dependente, e têm sido postulados como marcadores biológicos precoces do processo carcinogênico, sendo considerados lesões pré-neoplásicas, que se desenvolverão em câncer colorretal ao longo do tempo (67, 22).

Os estudos experimentais utilizando os FCAs vêm sendo largamente empregados para detectar possíveis fatores que possam influenciar a carcinogênese colorretal nos seus estágios iniciais (68, 60). Essas alterações relacionadas ao processo de transformação neoplásica podem ser caracterizadas e quantificadas, podendo ser utilizadas como biomarcadores indicadores da provável progressão para câncer (68, 60).

Estudos evidenciaram a presença de grande número de FCAs em ratos tratados com cancerígenos químicos como a DMH, sendo que um número significativo desses ratos desenvolveu tumores colônicos, mostrando que os FCAs podem ser utilizados como bons marcadores de transformação neoplásica em cólons (69).

Diferentes respostas ao carcinógeno DMH são encontradas em diferentes linhagens de roedores, verificando-se a existência de linhagens mais resistentes e mais susceptíveis ao aparecimento de FCAs e posterior desenvolvimento de câncer de cólon, quando induzidos por este carcinógeno (70).

Neste tipo de estudo identificam-se, com maior frequência, os FCAs no cólon esquerdo de roedores, sendo observada sua existência nas primeiras semanas após a exposição a carcinógenos como a DMH (66, 71). Os FCAs são facilmente visíveis em exames microscópicos do cólon corado com azul de metileno (22).

Embora ainda existam algumas controvérsias, aceita-se hoje que os FCAs representem lesões pré-neoplásicas, podendo ser bons marcadores da oncogênese do cólon (22, 69). Estas lesões pré-neoplásicas se caracterizam morfológicamente por apresentarem criptas com aberturas terminais alteradas, espessamento epitelial com células proeminentes e tamanho maior que as criptas adjacentes (72). Este tipo de lesão é também encontrada na mucosa de cólon humano, mais freqüentemente em pacientes portadores de Polipose Familiar de Cólon (73).

Não se conhecem os mecanismos da transformação de FCAs em neoplasias, mas sabe-se da existência de relação entre alterações de oncogenes e de mecanismos genéticos com a formação de FCAs. Assim, por exemplo, mutações no gene K-ras e na proteína p53, envolvidos no desenvolvimento de câncer de cólon, estão associadas com o aumento do número de FCAs por campo e desenvolvimento de tumores colônicos (67). Um outro estudo mostra que FCAs com multiplicidade e aumento de criptas apresentam resistência à morte celular por apoptose, da mesma forma como ocorre em lesões pré-neoplásicas de câncer de fígado (22).

Após a constatação dos FCAs, muitos estudos foram realizados para estimar o seu número, tamanho e distribuição no cólon de roedores submetidos à ação de carcinógenos (66, 73, 74, 69). Graças a estes estudos hoje é possível avaliar o papel de diversos fatores, tais como nutrientes, drogas e outros fatores individuais e ambientais, na predisposição ou proteção ao desenvolvimento do câncer de cólon.

Como os FCAs são considerados bons marcadores biológicos do processo de transformação neoplásica, por serem as modificações mais iniciais do desenvolvimento neoplásico em nível morfológico (66), o estudo de sua incidência e morfologia poderia trazer novas informações que auxiliem no entendimento da relação entre a atividade física e a carcinogênese.

2.3.3 - As criptas com acúmulo de beta-catenina (CABC)

A beta-catenina (BC), uma proteína de peso molecular 92.000 daltons, originalmente encontrada conjugada com a e-caderina (75), parece ter sua região terminal nitrogenada (NH₂) relacionada à adesão célula-célula (76). A BC também forma um complexo com a proteína produto do gene APC, e também com a condutina (77), o que leva à degradação da BC por proteossomas (*down-regulation*). Quando os genes BC e APC são mutados ou a via sinalizadora designada *Wnt* é ativada, a BC acumula no citossol, liga-se à proteínas do fator de transcrição *T-cell factor family* (TCF), e se move para o núcleo (78, 79). Isso resulta no aumento de expressão (*up-regulation*) de vários genes tais como C-myc (80, 78, 79), e Cyclin D (81), que têm importância na carcinogênese.

A BC tem sido apontada como um fator de ativação transcricional, quando conjugada com outros fatores da família TCF, proteínas ligantes do DNA (82, 83). Recentemente, genes da via BC-TCF foram designados como genes relacionados à proliferação celular, assim como o C-myc e o Cyclin D1 (80, 81), o que sugere que a via BC-TCF é oncogênica. É também sabido que os níveis celulares da proteína BC são regulados pela sua degradação via ubiquitina-proteassoma (84), via que é regulada pelo gene APC (85, 86). Mutações dos genes APC ou BC, as quais estão associadas com a grande maioria dos tumores de cólon em humanos e em ratos (87, 88), afetam a degradação da proteína BC e promovem sua acumulação citoplasmática e nuclear (89), o que leva à ativação da via oncogênica BC-TCF.

Excesso de BC tem sido demonstrado em muitos tumores de cólon em ratos e em humanos (90). Um estudo recente indicou que a expressão nuclear de BC é associada ao tamanho do tumor na carcinogênese colônica (88). Mais recentemente, foi demonstrado que a mutação do gene BC e o acúmulo de sua proteína estão envolvidos no estágio inicial da carcinogênese colônica induzida em ratos, através do carcinógeno químico AOM (91). De maneira interessante, o acúmulo de BC foi mais proeminente nas criptas sem aparência de FCAs. Foi formulada a hipótese de que essas criptas com excesso de BC, designadas como Criptas com Acúmulo de Beta-Catenina (CABC), são lesões independentes dos FCAs, sendo precursoras diretas do câncer de cólon (92).

O termo FCA do tipo displásico vem sendo usado em experimentos com animais e em humanos. Alguns autores (93-95) mostraram que a mutação do gene BC estava presente apenas nos FCAs do tipo displásico, sendo que algumas CABC coincidem com os FCAs do tipo displásico. Outros dados sugerem também que, como apenas a minoria das CABC se transforma em tumores, apenas as CABC com um tipo específico de mutação progredem para o câncer de cólon (89). Também é provável que a mutação de outros genes e mecanismos epigenéticos estejam envolvidos na progressão para o câncer (89).

Os FCAs são identificados microscopicamente na mucosa colônica de humanos, e se classificam como lesões de proliferação monoclonal (72, 96), as quais exibem variados graus de patogenicidade, desde uma atipia menor até displasias mais severas (72). A descoberta de uma proporção significativa

de expressão aberrante de BC (54%) nos FCAs do tipo displásico sugere que a disfunção de BC é um evento inicial no desenvolvimento de câncer de cólon em humanos. O fato de que todas as três alterações fenotípicas (diminuição da expressão de BC na membrana celular, e aumento da BC no citoplasma e no núcleo) aumentam significativamente com o aumento da displasia sugere que cada uma dessas alterações fenotípicas refletem o papel da BC na progressão dos FCAs. Em acréscimo, também se sabe que essas alterações fenotípicas estão muito aumentadas com a progressão dos FCAs displásicos para adenomas e carcinomas (91, 97-102).

Conforme citado acima, a ativação da via BC-APC desempenha um importante papel na carcinogênese colônica (79), e as mutações dos genes APC e BC (103, 104) ocorrem precocemente nesse processo, ainda na fase adenomatosa.

Os mecanismos que levam ao acúmulo de BC no citoplasma e sua expressão no núcleo ainda estão pouco entendidos. As mutações dos genes APC e BC ocorrem em aproximadamente 80% dos tumores de cólon em humanos, e sabidamente levam ao acúmulo de BC no citoplasma (79). Os dados disponíveis atualmente sugerem que estas mutações muito provavelmente não respondem pelo montante de acúmulo de BC observado nos FCAs, devido ao fato dos genes APC e BC mutantes terem sido pobremente encontrados nos FCAs em humanos (104-106).

Mais recentemente foi demonstrado, por imunohistoquímica, em pólipos adenomatosos (humanos), que 100% de suas células apresentavam expressão citoplasmática e nuclear de BC (107). Também por

imunohistoquímica, demonstrou-se que a proteína APC era encontrada em 62% desses pólipos, e apenas 29% destes apresentavam uma total ausência daquela proteína (107). Entretanto, até que ensaios mutacionais e imunohistoquímicos para os genes APC e BC, com sensibilidade similar, sejam realizados no mesmo FCA, essa questão não será totalmente resolvida.

Também tem sido demonstrado que o óxido nítrico aumenta os níveis citoplasmáticos e nucleares de BC em cultura de células epiteliais de camundongos (108) e poderia responder por uma parte da modulação da BC que se observa. Foi observado também que os níveis da enzima óxido nítrico sintetase induzível, que é a principal responsável pela produção de óxido nítrico, estavam reduzidos nas células epiteliais de 50% dos tumores de cólon em humanos e nos FCAs estudados (97); entretanto, um aporte adicional de óxido nítrico poderia ser provido pelas células do estroma, que estão freqüentemente presentes na mucosa colônica e nos tumores.

Conforme descrito no item 2.3.2, principalmente durante a última década, numerosos estudos, inclusive análises biomoleculares, têm focado os FCAs como supostas lesões pré-neoplásicas na carcinogênese colônica (22, 67, 73). Todavia, existem algumas evidências que documentam uma ausência de correlação entre o desenvolvimento de tumores colônicos e a expressão de FCAs (109, 110).

Apesar dos FCAs serem utilizados como biomarcadores pré-neoplásicos para estudos de potenciais agentes quimioprotetores contra o desenvolvimento do câncer colorretal, têm-se demonstrado que alguns

compostos como a genisteína, que têm potencial para prevenir a ocorrência dos FCAs, sabidamente estão ligadas ao desenvolvimento do câncer colorretal (111-113). Recentemente, foi encontrado que o ácido cólico, um conhecido agente promotor da carcinogênese colônica, inibe a formação dos FCAs, enquanto estimula o desenvolvimento das CABC (114). Estes resultados sugerem que as CABC são mais confiáveis que os FCAs como biomarcadores da carcinogênese colônica. Entretanto, devido à simplicidade dos ensaios com os FCAs, estes ainda continuam sendo aplicáveis como biomarcadores da carcinogênese colônica nos estudos de rastreamento de possíveis agentes protetores contra o desenvolvimento do câncer de cólon.

2.4. – Hipóteses

.As hipóteses para esse estudo são: 1) A utilização tanto dos FCAs quanto das CABC (além da análise da resposta proliferativa epitelial) como marcadores biológicos precoces na carcinogênese colônica pode permitir uma maior acurácia e amplitude de dados sobre a relação entre este tipo de câncer e a atividade física, 2) os efeitos da atividade física na carcinogênese química do cólon já ocorrem nas fases mais precoces do processo oncogênico, e 3) o tipo de efeito depende das características da atividade física realizada.

3 - OBJETIVOS

Através de um modelo experimental de carcinogênese química do cólon:

3.1. Estabelecer um modelo efetivo e rápido para o estudo da relação entre a atividade física e o câncer de cólon,

3.2. Verificar os efeitos da atividade física nas etapas iniciais da carcinogênese colônica,

3.3. Avaliar o efeito do treinamento físico crônico na prevalência de biomarcadores de transformação neoplásica do cólon,

3.4. Avaliar o efeito do exercício físico exaustivo na prevalência de biomarcadores de transformação neoplásica do cólon,

3.5. Avaliar o efeito do treinamento físico crônico associado ao exercício físico exaustivo na prevalência de biomarcadores de transformação neoplásica do cólon.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram utilizados setenta ratos Wistar, machos, de aproximadamente 250g ao início do experimento. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia, em condições de temperatura ambiente constante e ciclo noite-dia de doze horas. Foram alimentados com dieta padrão Purina® para ratos e água de torneira *ad libitum*. Os animais foram acomodados em número de quatro ou cinco por gaiola e posteriormente em número de três devido ao seu crescimento. Os animais foram mantidos segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

4.2 - Delineamento Experimental

Os animais foram separados em sete grupos de 10 (dez), após um período de adaptação. Cinco grupos (II, III, V, VI e VII) foram submetidos a exercício físico tipo natação, e dois (I e IV), foram constituídos de animais que permaneceram sedentários durante o experimento (grupos-controle) (Figura 1). Os animais do grupos I a III não receberam a aplicação do carcinógeno.

A natação foi realizada em recipientes plásticos de 100 cm de altura, completos com água até a altura de 60 cm, e mantidos à temperatura de 35°C, aproximadamente. Durante o protocolo de exercício, os ratos do grupo controle foram mantidos em contato com a água, em recipientes plásticos completos com água até 3 cm de altura, à 35°C, aproximadamente (11, 117).

Durante a realização do protocolo de natação (oito semanas), os ratos permaneceram acondicionados no Biotério do Laboratório de Neurofisiologia e Fisiologia do Exercício Experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, sob as mesmas condições descritas no item 4.1.

Os animais do grupo II foram submetidos a uma sessão de exercício físico agudo exaustivo por natação (A), segundo o protocolo de DAWSON em 1970 (117), sendo sacrificados quinze dias após.

Os animais do grupo III foram submetidos a treinamento físico tipo natação, com esforço moderado (C), segundo o protocolo de VENDITTI em 1996 (11), ao longo de oito semanas. Os ratos foram sacrificados quinze dias após a realização do treinamento.

Os animais do grupo V foram submetidos a uma sessão de exercício físico agudo exaustivo por natação (A) (117), imediatamente antes de receberem aplicação de carcinógeno, sendo sacrificados quinze dias após.

Os animais do grupo VI foram submetidos a treinamento físico tipo natação, com esforço moderado (C) (11), ao longo de oito semanas.

Em seguida receberam aplicação de carcinógeno. Os ratos foram sacrificados quinze dias após a aplicação do carcinógeno.

Os animais do grupo VII foram submetidos a uma sessão de exercício físico agudo exaustivo por natação (A), imediatamente antes de receberem aplicação de carcinógeno, e após terem sido previamente treinados com esforço moderado por natação (C), ao longo de 08 semanas (11, 117). Os ratos foram sacrificados quinze dias após a aplicação do carcinógeno.

Os grupos IV, V, VI e VII receberam a aplicação do carcinógeno no mesmo dia (Figura 1).

Figura 1. Delineamento experimental e nomenclatura dos grupos.

4.3 - Preparo do Carcinógeno

Foi utilizada *Symetrical Dimethylhydrazina Dihydrochloride* (Sigma Co) dissolvida na concentração de 800mg/100ml de solução de água destilada, contendo 37mg/100ml de EDTA como agente estabilizador. A solução foi

mantida em pH 6,5 pela adição de 15 a 20 gotas de hidróxido de sódio 0,1 Normal. A solução de DMH foi preparada imediatamente antes de cada aplicação.

4.3.1 - Segurança para a DMH

Armazenamento: a DMH foi armazenada em geladeira do próprio laboratório, em frascos devidamente identificados.

Manipulação: foi feita em pequenas quantidades com os pesquisadores utilizando aventais, máscaras, luvas e gorros. Após manipulação da droga o material utilizado foi imerso em solução saturada de permanganato de potássio, solução neutralizante.

4.3.2 - Aplicação do Carcinógeno

Os grupos IV, V, VI e VII receberam injeção única intra-peritoneal de DMH (50 mg/Kg de peso corporal) (69) (Figura 1).

4.4 - Coleta e processamento do cólon

Os animais foram sacrificados pelo éter. O cólon foi retirado e lavado com solução salina tamponada, imerso em formalina tamponada a 10%. Após 30 minutos a peça foi aberta longitudinalmente pela borda mesentérica e submetida ao exame macroscópico, anotando-se a incidência, distribuição,

tamanho e características das lesões. Em seguida o cólon foi estendido entre dois papéis de filtro e imerso em formalina tamponada a 10% durante 24 horas. Os segmentos foram corados com azul de metileno 0,1% durante 20 minutos.

4.5 – Avaliação dos biomarcadores da carcinogênese colônica

Para a avaliação dos biomarcadores da carcinogênese colônica foram utilizados oito ratos de cada grupo inicial, escolhidos aleatoriamente. O avaliador dos parâmetros, apresentados a seguir, era cego quanto à origem dos grupos, quando da análise e quantificação. Para a avaliação das CABC foram selecionados aleatoriamente seis ratos dentre os oito previamente escolhidos.

4.5.1 - Proliferação celular epitelial

A avaliação da proliferação celular foi feita através de imunomarcação do antígeno PCNA (do inglês *Proliferating cell nuclear antigen*), que identifica células em proliferação (65).

Este estudo foi realizado por coloração imunohistoquímica em tecidos colônicos fixados em formalina e inclusos em parafina. Cortes de 4µm montados em lâmina com camadas de poli-lisina foram deparafinizados, reidratados em uma série crescente de alcoóis, colocados em PBS, e tratados com hidrogênio 3% e metanol por 30 minutos a fim de bloquear a

atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram então submetidos à digestão enzimática com tripsina 0.1% em PBS por 20 minutos a 37° C. Ligantes protéicos não específicos foram bloqueados pela incubação do material com solução protéica à 3% (Leite Molico® desnatado em PBS) por 30 minutos. As fatias foram então incubadas primariamente com anticorpo monoclonal de ratos anti-PCNA, na diluição de 1:200 em PBS/BSA, e deixadas por uma noite à temperatura de 37° C. Num segundo passo, os cortes foram incubados com imunoglobulina de coelhos anti-ratos, como segundo anticorpo. O produto da reação foi detectado com o complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor da reação foi obtida com 3,3'-diaminobenzina com intensificação por níquel. As fatias foram contra coradas com azul de metileno. Os cortes controles foram incubados com PBS, no lugar do primeiro anticorpo. Células foram consideradas PCNA positivas apenas quando se identificaram manchas marrom-avermelhadas nos núcleos. Em seguida foi feita a quantificação de células positivamente e negativamente marcadas, para estabelecimento da proporção entre elas, estabelecendo-se o índice de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) por cripta, o qual é um parâmetro objetivo da proliferação celular (65).

4.5.2 – Focos de criptas aberrantes (FCAs)

Foi feito um rastreamento da mucosa de todo o cólon, através de exame com lupa adequada. Os FCAs foram identificados, quantificados e foi calculada a frequência (por unidade de área em cm²) e a distribuição ao longo do cólon (22).

4.5.3 – Criptas com acúmulo de beta-catenina (CABC)

Para identificação imunohistoquímica das CABC foi utilizado o método padronizado da estreptavidina-biotina (LSAB KIT; DAKO, Glostrup, Denmark). As secções de 0,3 a 0,5 µm, previamente embebidas em parafina, foram aquecidas por 30 minutos a 65°C, deparafinadas em xileno, e reidratadas por álcoois de crescentes graduações em temperatura ambiente. As secções foram tratadas por 40 minutos, em temperatura ambiente, com solução de albumina bovina a 2%, e incubadas por uma noite, a temperatura de 4°C, com anticorpos primários contra a proteína beta-catenina (diluição 1:1000, Transduction Laboratories, Lexington, KY). A reação foi identificada após coloração por tratamento com H₂O₂ e diaminobenzina por cinco minutos. A imunorreatividade foi considerada positiva se a coloração era detectada no citoplasma e/ou no núcleo das células. Em seguida foi feita a quantificação das criptas com células positivamente e negativamente marcadas, para estabelecimento da proporção entre essas criptas, estabelecendo-se o índice de CABC (iCABC) (118, 119).

4.6 - Análise estatística

Os resultados das médias das contagens do número de FCAs/cm², do iCABC, e dos índices de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) por cripta foram comparados entre os sete grupos, através do Teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 – A proliferação celular

Foram contadas 50 criptas por animal (o número total de células contadas por animal foi superior a 1000). Esta forma de avaliação é consonante com a metodologia mais recente, descrita na literatura internacional (120-124).

Foram analisadas 50 criptas do epitélio colônico por animal para a contagem de células marcadas pelo PCNA. Em cada cripta, estimou-se o número total de células e o número de células marcadas fortemente pelo PCNA. Foram consideradas apenas as células fortemente marcadas, procedimento que torna mais fidedigna a contagem para se estimar a proliferação celular do epitélio (122, 124) (Figura 2).

Após a contagem das 50 criptas, calculou-se a média do número de células marcadas e do total de células por cripta para cada animal. Os resultados estão expressos na tabela 1 (em anexo).

Figura 2 – Cripta com células marcadas para a presença de PCNA. Observe-se a presença de núcleos enegrecidos nos dois terços inferiores da cripta (setas), que correspondem às células com marcação positiva para PCNA.

A partir destes valores foi possível calcular o índice médio de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) por cripta por animal, através da fórmula:

$$iPCNA = Ncm/Ntc$$

Onde: Ncm significa o número médio de células marcadas para o PCNA por cripta por animal, e Ntc representa a média do número total de células por cripta por animal.

Os resultados do iPCNA para cada animal estão apresentados na tabela 3 (em anexo).

Finalmente, calculou-se o iPCNA por grupo experimental e realizou-se o teste estatístico para verificar a diferença dos resultados entre os grupos, conforme ilustra a Tabela 3 (em anexo).

Optou-se pela apresentação dos dados na forma observada na literatura científica mais recente (120, 121), que analisa os resultados dos estudos com PCNA através do iPCNA.

A comparação estatística entre os resultados dos sete grupos estudados está apresentada no Gráfico 1. Comparou-se todos os grupos entre si separadamente. Os dados dos animais apresentaram distribuição normal dentro de cada grupo, assim o Teste *t* de Student se mostrou adequado para análise estatística dos resultados.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os grupos I (sedentário) e II (exercício exaustivo) ($p=0,5784$), e entre os grupos I e III (treinamento físico) ($p=0,7438$), os quais não receberam a aplicação da DMH, mostrando que não houve resposta proliferativa nos protocolos de exercício físico sem a aplicação do carcinógeno (Gráfico 1).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os grupos I (sedentário sem DMH) e IV (sedentário com DMH) ($p<0,0001$), entre os grupos I e V (exercício exaustivo com DMH) ($p<0,0001$), entre os grupos I e VI (treinamento com DMH) ($p<0,0008$), e entre os grupos I e VII (treinamento mais exercício exaustivo com DMH) ($p=0,001$), mostrando

que o carcinógeno teve ação efetiva na resposta hiperproliferativa (Gráfico 1), independente do protocolo de exercício físico analisado.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os grupos IV (sedentário com DMH) e V (exercício exaustivo com DMH) ($p=0,1743$), mostrando que o exercício exaustivo não alterou a resposta hiperproliferativa em relação ao grupo sedentário, sob a ação da DMH (Gráfico 1).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os grupos IV (sedentário com DMH) e VI (treinamento com DMH) ($p<0,0001$), mostrando que o grupo submetido ao treinamento físico apresentou menor resposta hiperproliferativa em relação ao grupo sedentário, sob a ação da DMH (Gráfico 1).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os grupos IV (sedentário com DMH) e VII (treinamento mais exercício exaustivo com DMH) ($p<0,0001$), mostrando que o grupo submetido ao treinamento físico crônico mais exercício exaustivo agudo, apresentou menor resposta hiperproliferativa em relação ao grupo sedentário, sob a ação da DMH (Gráfico 1).

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os grupos VI (treinamento com DMH) e VII (treinamento mais exercício exaustivo com DMH) ($p=0,9090$), mostrando que não houve alteração da resposta hiperproliferativa entre os grupos, sob a ação da DMH (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Comparação estatística entre os resultados dos sete grupos estudados em relação ao iPCNA médio por grupo, e respectivos desvios-padrões.

5.2 - Contagem de FCAs

Foi observada a presença de FCAs no cólon de todos os animais submetidos à aplicação de DMH (grupos IV a VII) (Figura 2). Nos grupos I a III não houve aparecimento de FCAs.

Após a observação de trinta campos microscópicos por animal, calculou-se a média do número de focos de criptas aberrantes por cm^2 (FCAs/ cm^2) por animal, e a média do número de FCAs/ cm^2 e respectivos desvios-padrões por grupo (IV a VII). Os resultados estão expressos na tabela 4 (em anexo).

Figura 3 – Focos de Criptas Aberrantes (setas) em cólon de animal sedentário submetido à aplicação de DMH.

A comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados (IV a VII) em relação aos FCAs está apresentada no Gráfico 2. Comparou-se todos os grupos entre si separadamente. Os dados dos animais apresentaram distribuição normal dentro de cada grupo, assim o Teste *t* de Student se mostrou adequado para análise estatística dos resultados.

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número médio de FCAs/cm² entre os grupos IV (sedentário com DMH) e V (exercício exaustivo com DMH) ($p < 0,0001$), mostrando que houve aumento do número

de FCAs no grupo de animais sedentários submetidos agudamente ao exercício exaustivo, em relação ao grupo que permaneceu sedentário (Gráfico 2).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número médio de FCAs/cm² entre os grupos IV (sedentário com DMH) e VI (treinamento com DMH) ($p < 0,0001$), mostrando que houve diminuição do número de FCAs no grupo de animais submetidos cronicamente ao treinamento físico, quando comparado em relação ao grupo que permaneceu sedentário (Gráfico 2).

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número médio de FCAs/cm² entre os grupos IV (sedentário com DMH) e VII (treinamento mais exaustivo com DMH) ($p = 0,9208$), mostrando que não houve alteração significativa no número de FCAs no grupo de animais submetidos cronicamente ao treinamento físico e, logo após, a uma sessão aguda de exercício exaustivo, quando comparado em relação ao grupo que permaneceu sedentário (Gráfico 2).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número médio de FCAs/cm² entre os grupos V (exercício exaustivo com DMH) e VII (treinamento mais exercício exaustivo com DMH) ($p < 0,0001$), mostrando que houve diminuição do número de FCAs no grupo de animais submetidos agudamente ao exercício exaustivo, após treinamento físico crônico, quando comparado em relação ao grupo sedentário que foi apenas submetido agudamente ao exercício físico exaustivo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados, em relação ao número médio de FCAs/cm² por grupo, e respectivos desvios-padrões.

5.3 – Contagem das CABC

A imunomarcagem para beta-catenina (BC) evidenciou, em todos os animais submetidos à aplicação de DMH, a presença de criptas isoladas ou em pequenos grupos, com intenso acúmulo da proteína BC no citoplasma das células (Figura 4). Nos Grupos I a III não houve aparecimento das CABC.

Foram analisados 30 campos microscópicos por animal para a identificação das CABC. Em cada animal, estimou-se o número total de CABC em relação ao número total de criptas observado. Os resultados estão expressos na tabela 5 (em anexo).

Resultados

A partir destes valores foi possível calcular o índice médio de CABC por grupo (iCABC), através da fórmula:

$$iCABC = Nc/Nt$$

Onde: Nc significa o número médio de CABC por animal, e Nt representa a média do número total de por criptas por animal.

Os resultados do iCABC para cada grupo também estão apresentados na tabela 5 (em anexo).

Figura 4 – Criptas positivamente marcadas para a presença de acúmulo de beta-catenina (setas).

A comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados (IV a VII) em relação às CABC está apresentada no Gráfico 3. Comparou-se todos os grupos entre si separadamente. Os dados dos animais apresentaram distribuição normal dentro de cada grupo, assim o Teste *t* de Student se mostrou adequado para análise estatística dos resultados.

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao iCABC entre os grupos IV (sedentário com DMH) e V (exercício exaustivo com DMH) ($p=0,0326$), mostrando que houve aumento do iCABC no grupo de animais sedentários submetidos agudamente ao exercício exaustivo, em relação ao grupo que permaneceu sedentário (Gráfico 3).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao iCABC entre os grupos IV (sedentário com DMH) e VI (treinamento com DMH) ($p=0,0096$), mostrando que houve diminuição do iCABC no grupo de animais submetidos cronicamente ao treinamento físico, quando comparado em relação ao grupo que permaneceu sedentário (Gráfico 3).

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao iCABC entre os grupos IV (sedentário com DMH) e VII (treinamento mais exaustivo com DMH) ($p=0,1306$), mostrando que não houve alteração significativa no iCABC no grupo de animais submetidos cronicamente ao treinamento físico e, logo após, a uma sessão aguda de exercício exaustivo, quando comparado em relação ao grupo que permaneceu sedentário (Gráfico 3).

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao iCABC entre os grupos V (exercício exaustivo com DMH) e VII (treinamento mais exercício exaustivo com DMH) ($p < 0,0001$), mostrando que houve diminuição do iCABC no grupo de animais submetidos agudamente ao exercício exaustivo, após treinamento físico crônico, quando comparado em relação ao grupo sedentário que foi apenas submetido agudamente ao exercício físico exaustivo (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparação estatística entre os resultados dos quatro grupos estudados em relação ao iPCNA médio por grupo, e respectivos desvios-padrões.

6 - DISCUSSÃO

No presente experimento, foi demonstrado que uma sessão aguda de exercício físico exaustivo em grupos de ratos sedentários (grupo V) foi associada com aumento estatisticamente significante na resposta hiperproliferativa, no número de FCAs/cm², e no iCABC em cólons tratados com a DMH, quando comparados com o grupo-controle (grupo IV). Os mecanismos por trás desse achado precisam ser mais bem estudados. É sabido que um aumento nos níveis de estresse oxidativo, e também a depressão da função imune, eventos associados ao exercício exaustivo, poderiam promover o desenvolvimento desses marcadores da carcinogênese colônica (116).

Por outro lado, os grupos de ratos submetidos ao treinamento físico crônico (grupo VI) apresentaram redução estatisticamente significante na resposta hiperproliferativa, no número de FCAs/cm², e no iCABC em cólons tratados com a DMH, quando comparados com o grupo-controle (grupo IV).

Essa redução foi ausente, ou não significante, nos grupos submetidos também ao exercício físico exaustivo agudo (grupo VII), com a exceção do parâmetro proliferativo (iPCNA), no qual houve redução da resposta hiperproliferativa, sem distinção em relação ao treinamento físico crônico apenas. Esse último resultado, pouco contraditório, ocorreu, provavelmente, porque os estudos com biomarcadores diferem na sensibilidade à detecção dos efeitos anti ou pró-carcinogênicos dos protocolos realizados. Pode-se

levantar duas hipóteses: 1) que o exercício exaustivo agudo, após o treinamento físico crônico, tenha atenuado os benefícios deste último quanto à proteção contra o desenvolvimento dos marcadores da carcinogênese colônica; e 2) que o treinamento físico crônico possa ter amenizado os efeitos maléficos observados quanto à sessão aguda de exercício exaustivo. Outros delineamentos experimentais deverão ser desenvolvidos para elucidar melhor essa questão.

Os três biomarcadores empregados mostraram resultados coerentes no que tange à prevalência destes nas diferentes situações experimentais aferidas, o que demonstra a confiabilidade e a utilidade do modelo experimental utilizado. Com base nas características dos biomarcadores utilizados neste estudo, conforme descrito no item 2.4, os efeitos benéficos e deletérios observados sobre a carcinogênese colônica experimental, em relação a diferentes protocolos de atividade física, podem estar envolvidos ainda na fase de iniciação e promoção das neoplasias colônicas, inclusive relacionados a fatores de adesão célula-célula, como vem se discutindo na literatura científica recente, nos trabalhos que envolvem as CABC (91).

6.1 – Possíveis mecanismos biológicos envolvidos

É bem conhecido que o exercício físico moderado, desenvolvido de maneira regular e apropriada, está associado a uma redução da incidência de câncer de cólon em humanos e em animais (125). Os resultados observados nesse estudo em relação ao treinamento físico crônico corroboram essa

associação, mostrando que a ação da atividade física pode ocorrer já nas fases mais precoces da transformação neoplásica.

Por outro lado, nesse estudo, foi mostrado que o exercício exaustivo pode estar relacionado a um aumento na susceptibilidade para o desenvolvimento de câncer de cólon em ratos sedentários.

É sabido que o exercício físico expõe o organismo ao estresse oxidativo, através do aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) (126). O aumento do número de ROS pode potencialmente causar danos aos lipídeos, proteínas e ao DNA (126). As ROS podem também levar à mutagênese celular e induzir a proliferação de células tumorais (127). O organismo tem, no entanto, um sistema de defesa contra as ROS, chamado sistema de defesa antioxidante (127). Em geral, o organismo tem reservas adequadas de antioxidantes para balancear a produção de ROS nas condições fisiológicas. Entretanto, quando essa produção é excessiva (o que pode acontecer num exercício físico muito prolongado, intenso ou exaustivo), a defesa pode se tornar inadequada, sendo suplantada pela produção de ROS, levando ao estresse oxidativo, à lesão celular e tissular.

Alguns estudos têm reportado o aumento de lesões oxidativas em exercícios extremos (128, 129), porém não em exercícios moderados (130). Existe evidência de associação positiva entre a prática de exercício físico moderado e regular e a melhora do sistema de defesa antioxidante, principalmente na capacidade de reparo enzimático (131), embora existam alguns estudos que reportam um aumento na depleção do sistema antioxidante (132). O treinamento físico tem sido associado a uma diminuição

na perda de funcionalidade do sistema antioxidante que normalmente ocorre no envelhecimento (133). Assim, o exercício de moderada intensidade pode ser significativamente benéfico para melhorar a função de enzimas antioxidantes, as quais são essenciais para combater a produção diária de ROS. Exercícios muito intensos ou exaustivos, no entanto, poderiam levar a um aumento na produção de ROS que suplantasse o sistema de defesa antioxidante, podendo levar ao aumento de danos oxidativos às células e à mutagênese celular (127).

Os danos oxidativos e o sistema de reparo associados ao exercício têm o potencial de afetar todos os tipos de câncer, em todas as idades. A capacidade de reparo antioxidante é de maior significância quando o tecido ou órgão afetado têm grande capacidade proliferativa e quando no reparo estão envolvidas mutações críticas para a proliferação celular, como é o caso do câncer de cólon. Os mecanismos de reparo do DNA provavelmente serão menos eficazes quando o tecido é ou está em estado proliferativo rápido, o que ocorre quando da aplicação do carcinógeno químico (133).

Assim, é plausível que a atividade física possa ser benéfica ou deletéria, dependendo da intensidade ou rigor do protocolo de treinamento, e das características ou estado dos organismos submetidos a esses protocolos, o que pode explicar, em parte, os resultados desse estudo. Um fato a ser considerado é que a BC é degradada no citoplasma pela via ubiquitina-proteassoma (84), que também participa da resposta de defesa contra os efeitos deletérios relacionados ao estresse oxidativo (155), sendo um possível mecanismo de ligação entre os processos.

O papel da insulina como promotor da carcinogênese em vários órgãos, incluindo o cólon, também deve receber atenção (134, 153). Tem sido demonstrado que os níveis séricos de insulina estão elevados em indivíduos com câncer e sem outras doenças relacionadas à hiperinsulinemia (135). Tem sido demonstrado que isso poderia ocorrer também em relação às neoplasias de cólon, além de outras; nas quais a prevalência de hiperinsulinemia é positivamente associada com a incidência do câncer (136, 137).

Os níveis séricos de insulina são fortemente influenciados pelos níveis de atividade física (137, 138). O treinamento físico resulta num aumento da sensibilidade à insulina, resultando em menores níveis circulantes desse hormônio (140, 141). A hiperinsulinemia produz um aumento nos níveis circulantes do fator de crescimento similar à insulina (*insulin-like growth factor-1*) (IGF-1) e diminui os níveis circulantes das proteínas carreadoras desse fator (aumentando sua biodisponibilidade no sangue) (142). O IGF-1 tem sido apontado como um fator importante na promoção da carcinogênese (143). É sabido que o exercício físico agudo tem associação com aumento nos níveis de IGF-1 (144, 145), enquanto há diminuição desses níveis no treinamento físico crônico (144, 146), o que também pode ter alguma implicação nos resultados desse experimento.

Excelentes revisões têm sido publicadas sobre os efeitos da atividade física na resposta imune (147, 148). Evidências atuais sugerem que a maioria das neoplasias humanas não são geradas por fatores relacionados à

vigilância imunológica específica. No entanto, o câncer humano é em algum grau susceptível ao controle pelos mecanismos imunes inatos.

O exercício e o treinamento físico parecem afetar uma variedade de parâmetros do sistema imunológico inato, numérica e funcionalmente (43, 149). Linfócitos T-citotóxicos, células *natural killer* (NK), células LAK (*lymphokine-activated killer cells*), e monócitos/macrófagos desempenham um papel de vigilância, eliminando células anormais. O exercício regular e moderado parece promover a proliferação de linfócitos, aumentar o número de células NK e aumentar a atividade das células LAK (147).

Os efeitos do exercício físico sobre o sistema imune são freqüentemente indicados como possíveis moduladores na carcinogênese. A modulação do sistema imune pelo exercício tem o potencial tanto de inibir a carcinogênese (pela melhora da função imune), quanto de promover o câncer (através da supressão do sistema imune). Conforme tem sido observado para o trato respiratório superior (150), pouco exercício ou o excesso desse poderia aumentar o risco para o câncer se o sistema imune estiver envolvido no mecanismo da relação câncer-atividade física, o que pode estar ocorrendo nesse estudo.

De maneira interessante, conforme observado neste experimento, há uma semelhança de relação entre a atividade física e o câncer, e entre o exercício e as infecções, como demonstrado por Nieman (150, 151). Esse autor tem sugerido que a incidência de infecções, principalmente das vias aéreas superiores, pode ser diminuída através do exercício físico regular e moderado em relação aos sedentários, mas, por outro lado, pode ser

bastante aumentada nos indivíduos praticantes de exercício de grande intensidade.

6.2 – Possíveis efeitos da atividade física na carcinogênese humana

O fato da atividade física ter efeito sobre o desenvolvimento tumoral é persuasiva, mas ainda incompleta. A relação entre câncer e atividade física é complexa. O câncer não é simplesmente uma doença única, mas uma multiplicidade de patologias envolvendo aspectos genéticos e ambientais.

Como poderia um estilo de vida fisicamente ativo ter impacto na carcinogênese? Até o momento, os mecanismos que explicam a inibição do processo neoplásico mediante um aumento na quantidade de atividade física praticada permanecem obscuros. Diversas associações biológicas lógicas já foram levantadas para se explicar a relação entre câncer e atividade física (152), mas nenhuma explica essa relação na sua complexidade.

Não foi objetivo deste trabalho a elucidação dos mecanismos biológicos que possam estar envolvidos nos efeitos de diferentes tipos de exercício na carcinogênese colônica, mas algumas hipóteses puderam ser aventadas, as quais podem ser alvo de novos estudos no futuro.

Não há um modelo único para se estudar todos os aspectos envolvidos nos estudos que relacionam câncer e atividade física, tais como a prevenção e o controle dos tumores. Estudos nos quais mais de um modelo animal sejam utilizados podem ser necessários para o entendimento de como a atividade física e o exercício afetam o macro e o microambiente regulatório

(da mucosa colônica, por exemplo) durante a exposição aos carcinógenos ou durante a progressão tumoral e formação de metástases (33).

Independentemente do modelo experimental, estes nunca substituirão os estudos epidemiológicos ou os ensaios clínicos nos estudos envolvendo câncer e atividade física, haja vista as limitações já comentadas anteriormente (item 2.2.2).

A partir dos dados do presente estudo experimental, apenas é possível aventar que o exercício físico exaustivo aumenta a susceptibilidade para o câncer de cólon em ratos sedentários, e que o treinamento crônico pode reduzi-la. Entretanto, também permitem construir a hipótese de que, de maneira similar à relação sugerida entre a atividade física e as infecções, a atividade física poderia ter um efeito protetor contra o desenvolvimento do câncer, se praticada regular e moderadamente, ou poderia aumentar o risco para o desenvolvimento do mesmo, dependendo do tipo, intensidade e duração da atividade realizada.

7 - CONCLUSÕES

7.1. Os três biomarcadores empregados mostraram resultados coerentes no que tange à prevalência destes nas diferentes situações experimentais aferidas, o que demonstra a confiabilidade e a utilidade do modelo experimental utilizado.

7.2. Tendo em vista os biomarcadores e intervalos de tempo avaliados, pode-se concluir que os efeitos da atividade física já ocorrem nas etapas mais precoces da carcinogênese colônica.

7.3. O treinamento físico crônico teve efeito protetor contra o desenvolvimento dos biomarcadores de transformação neoplásica do cólon.

7.4. O exercício físico exaustivo aumentou a prevalência dos biomarcadores de transformação neoplásica do cólon em ratos sedentários.

7.5. O treinamento físico crônico, quando associado ao exercício físico exaustivo, não alterou a prevalência dos biomarcadores de transformação neoplásica do cólon, com exceção do parâmetro proliferativo, que teve sua prevalência diminuída.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 – MCTIERNAN, A. Physical activity, exercise, and cancer: prevention to treatment—Symposium overview. Symposium—Physical activity, exercise, and cancer: Prevention to treatment. **Med. Sci. Sports Exerc.**, V.35, p.1821–1822, 2003.
- 2 - NIEMAN, D.C: **The exercise-health connection**. Human Kinetics Ed., 1999.
- 3 - CHERRY, T. A theory of cancer. **Med. J. Aust**, v.1, p.425–438, 1922.
- 4 – THUNE, I.; SMELAND, S. Can physical activity prevent cancer? **Tidsskr Nor Laegeforen**, v.10; n.120(27), p.3296-3301, nov 2000.
- 5 - LEE, I. Physical activity and cancer prevention—Data from epidemiologic studies. Symposium—Physical activity, exercise, and cancer: Prevention to treatment. **Med. Sci. Sports Exerc.** V. 35, p.1823–1827, 2003.
- 6 - MARRETT, L.D.;THEIS, B.; ASHBURY, F.D. Workshop report: physical activity and cancer prevention. **Chronic Dis. Can**, v.21, p.143–149, 2000.

- 7 - HARDMAN, A.E. Physical activity and cancer risk. **Proc. Nutr. Soc**, v.60, p.107–113, 2001.
- 8 - ALBERTS, D.S. Reducing the risk of colorectal cancer by intervening in the process of carcinogenesis: a status report. **Cancer J**, v.8, p.208–221, 2002.
- 9 - FRIEDENREICH, C.M.; ORENSTEIN, M.R. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. **J. Nutr**, v.132, p.3456S–3464S, 2002.
- 10 – WILLIAMSON, G.M. Extending the activity restriction model of depressed affect: evidence from a sample of breast cancer patients. **Health Psychol**, v.19(4), p.339-47, jul 2000.
- 11 - VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.331, p.63–68, 1996.
- 12 - ARDIES, C.M. Exercise, cachexia, and cancer therapy: a molecular rationale. **Nutr. Cancer**, v.42, p.143–157, 2002.
- 13 - MACERA, C.A.; HOOTMAN, J.M.; SNIEZEK, J.E. Major public health benefits of physical activity. **Arthritis Rheum.**, v.49, p.122–128, 2003.

- 14 - BANERJEE, A.K. et al. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Mol. Cell. Biochem.**, v.307, p.307–312, 2003.
- 15 - ASAMI, S.T. et al. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.243, p.678–682, 1998.
- 16 - POULSEN, H.E.; WEIMANN, A.; LOFT, S. Methods to detect DNA damage by free radicals: relation to exercise. **Proc. Nutr. Soc.**, v.58, p.1007–1014, 1999.
- 17 – JI, L.L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. **Ann N Y Acad Sci**; v.959, p.82-92, apr 2002.
- 18 - JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Int. J. Sport Nutr.**, v.3, p.356–375, 1993.
- 19 - MAHAN, M.P.; YOUNG, M.R. Immune parameters of untrained or exercise-trained rats after exhaustive exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.66, p.282–287, 1989.
- 20 - SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N. Effects of exercise and training on natural killer cell counts and cytolytic activity: a metaanalysis. **Sports Med.**, v.28, p.177–195, 1999.

- 21 - LINDA, M.; CASTELL, M.A. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition**, v.18, p.371–375, 2002.
- 22 - BIRD, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.**, v.93, p.55–71, 1995.
- 23 - FODDE, R. The APC gene in colorectal cancer. **Eur. J. Cancer**, v.38, p.867–871, 2002.
- 24 – CAMPLEJOHN, R.S. et al. Apoptosis, ageing and cancer susceptibility. **Br J Cancer.**, v.24, n.88(4), p.487-90, feb 2003.
- 25 - KUBBEN F.J. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. **Gut.**, v.35(4), p.530-5, apr 1994.
- 26 – MILLS, S.J. et al. Colonic crypt cell proliferation state assessed by whole crypt microdissection in sporadic neoplasia and familial adenomatous polyposis. **Gut.**, v.48(1), p.41-6, jan 2001.
- 27 – FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.1, n.61(5), p.759-67, jun 1990.

- 28 – LINDBLOM, A. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. **Curr Opin Oncol**, v.13(1), p.63-9. Review, jan 2001.
- 29 – MUTO, T. et al. Colorectal carcinogenesis: historical review. **Dis Colon Rectum.**, v.40(10 Suppl), p.S80-5, oct 1997.
- 30 - MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. INCA, Instituto Nacional de Câncer. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Rio de Janeiro, 2004. 94p.
- 31 - MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. Atividade física, saúde e envelhecimento. In: _____ **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. p. 605.
- 32 - PETERS H.P. et al. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. **Gut**, v.48(3), p.435-9, 2001.
- 33 - HOFFMAN-GOETZ, L. Physical Activity and Cancer Prevention: Animal-Tumor Models. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 35, n. 11, p.1828-1833, 2003.

-
- 34 - BALISH, R. et al. Effect of age, sex, and intestinal flora on the induction of colon tumors in rats. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.58, p.1103-1106, 1977.
- 35 - PORIES, S. E. et al. Animal models for colon carcinogenesis. **Arch. Surg**, v.128, p.647- 653, 1993.
- 36 - LEUTZINGER, Y.; RICHIE, J.P. The effect of animal age on tumor induction. In: Arcos, J.C. ed. **Chemical induction of câncer: modulation and combination effects**. Boston: Birkhauser, 1995, p. 373-95.
- 37 – DESCHNER, E.E: Experimentally induced cancer of the colon. **Cancer**, v.34, p.824-828, 1974.
- 38 – REDDY, B.S. et al. Colon Carcinogenesis with azoximetane and dimethylhydrazine in germ free rats. **Cancer Research**, 35:287-290, 1975.
- 39 – LAMONT, J.T.; O'GORMAN, T.A. Experimental Colon Cancer. **Gastroenterology**, v.75, p.1157-1169, 1978.
- 40 – ROGERS, A.E.; NAUSS, K.M. Rodent models for carcinoma of the colon. **Digestive Diseases and Sciences**, v.30, p.875-1025, 1985.

- 41 – OLIVEIRA, E.C. et al. Cronic *Tripanossoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, v.22(5), p.737-740, 2001.
- 42 – GREENE, F.L.; LAMB, L.S.; BARWICK, M. Colorectal cancer in animal models--a review. **J Surg Res.**, v.43(5), p.476-87, nov 1987.
- 43 - HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise, natural immunity, and experimental tumor metastasis. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.26, p.157-163, 1994.
- 44 - THOMPSON, H. J. Effects of physical activity and exercise on experimentally-induced mammary carcinogenesis. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.46, p.135-141, 1997.
- 45 - GIRARD, I.; GARLAND JR., T. Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. **J. Appl. Physiol.**, v.92, p.1553-1561, 2002.
- 46 - BARACOS, V. E. Exercise inhibits progressive growth of the Morris hepatoma 7777 in male and female rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.67, p.864-870, 1989.
- 47 - MAINI, A. et al. Comparative pathology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **In Vivo**, v.11, p.293-9, 1997.

- 48 - RUSSO, J. et al. Molecular and cellular basis of the mammary gland susceptibility to carcinogenesis. **Environ. Health Perspect.**, v.49, p.185-199, 1983.
- 49 - RUSSO, J. et al. **Tumors of the mammary gland**. Lyon: IARC Scientific Publications, No. 99, 1990, pp. 47-78.
- 50 - HOLLOSZY, J. O.; SCHECTMAN, K. B. Interaction between exercise and food restriction: effects on longevity of male rats. **J. Appl. Physiol.**, v.70, p.1529-1535, 1991.
- 51 - LAUGHLIN, M. H.; ARMSTRONG, R. B. Muscle blood flow during locomotory exercise. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v.13, p.95-136, 1985.
- 52 - BOLT, H. M. Pharmacokinetic factors and their implication in the induction of mouse liver tumors by halogenated hydrocarbons. **Arch. Toxicol. Suppl.**, v.10, p.190-203, 1987.
- 53 - HOFFMAN, S. A. et al. The influence of exercise on the growth of transplanted rat tumors. **Cancer Res.**, v.22, p.597-599, 1962.
- 54 - MOORE, C.; TITTLE, P. W. Muscle activity, body fat, and induced rat mammary tumors. **Surgery**, v.73, p.329-332, 1973.

- 55 - RUSCH, H. P.; KLINE, B. E. Exercise effects on growth of mouse tumour. **Cancer Res.**, v.4, p.116-118, 1944.
- 56 - KOBÆK-LARSEN, M. et al. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. **Comp. Med.**, v.50, p.16-26, 2000.
- 57 - ANDRIANOPOULOS, G. et al. The influence of physical activity in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in the rat. **Anticancer Res.**, v.7, p.849 -852, 1987.
- 58 – REDDY; B. S.; SUGIE, S.; LOWENFELS, A. Effect of voluntary exercise on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Cancer Res.**, v.48, p.7079-7081, 1988.
- 59 - THORLING, E. B.; JACOBSEN, N. O.; OVERVAD, K. The effect of treadmill exercise on azoxymethane-induced intestinal neoplasia in the male Fischer rat on two different high-fat diets. **Nutr. Cancer**, v.22, p.31-41, 1994.
- 60 - THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSEN, E. Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats. **Nutr. Cancer**, v.21, p.177-182, 1994.

- 61 - RUBIO, C. A.; TAKAYAMA, S. Difference in histology and size in colonic tumors of rats receiving two different carcinogens. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.13, p.191-197, 1994.
- 62 - GLAUERT, H. P.; WEEKS, J. A. Dose- and time-response of colon carcinogenesis in Fisher-344 rats after a single dose of 1,2-dimethylhydrazine. **Toxicol. Lett.**, v.48, p.283-287, 1989.
- 63 - KOBAEK-LARSEN, M. et al. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. **Comp. Med.**, v.50, p.16-26, 2000.
- 64 – OKADA, H. et al. Epithelial cell proliferation during colonic chemical carcinogenesis in the rat. **Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.11(7), p.686-91, 1996.
- 65 – SINGH, J. et al. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.18, p.833-41, 1997.
- 66 - BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, **Cancer Lett.**, v.37, p.147–151, 1987.

- 67 - SHIVAPURKAR, N. et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients, **Cancer Lett.**, v.115, p.39–46, 1997.
- 68 - MCLELLAN, E.A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon, **Carcinogenesis**, v.12, p.2093–2098, 1991.
- 69 - PARK, H.S.; GOODLAD, R.A.; WRIGHT, N.A: The incidence of Aberrant Crypt Foci and Colonic Carcinoma in Dimethylhydrazine-treated Rats Varies in a site-specific Manner and Depends on Tumor Histology. **Cancer Research**, v.57, p.4507-4510, 1997.
- 70 – ROSEMBERG, D.W.; LIU, Y. Induction of aberrant crypts in murine colon with varying sensitivity to colon carcinogenesis. **Cancer Letters**, v.92(2), p.209-14, 1995.
- 71 - MC LELLAN, K.R.; BIRD, R.P. Aberrant Cripts: Potential pre neoplastic lesions in murine colon. **Cancer Research**, v.48, p.6187-6192, 1988.
- 72 – SIU, I.M. et al. Identification of Displasia in Human Colonic Aberrant Crypt Foci. **American Journal of Pathology**, v.150, p.5-10, 1997.

-
- 73 – PRETLOW, T.P. et al. Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic Mucosa. **Cancer Research**, v.51, p.1564-1567, 1991.
- 74 – HARDMAN, W.E. et al. Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence. **Cancer Research**, v.51, p.388-6391, 1991.
- 75 - OZAWA, M.; BARIBAUT, H.; KEMLER, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. **EMBO J.**, v.8, p.1711–1717, 1989.
- 76 - OYAMA, T. et al. A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and beta-catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. **Cancer Res.**, v.54, p.6282–6287, 1994.
- 77 - BEHRENS, J. et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3. **Science**, (Wash. DC), v.280, p.596–599, 1998.
- 78 - MANN, B. et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.96, p.1603–1608, 1999.

- 79 - ILYAS, M. et al. Genetic pathways in colorectal and other cancers. **Eur. J. Cancer**, v.35, p.335–351, 1999.
- 80 - HE, T.C. et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science**, (Wash. DC), v.281, p.1509–1512, 1998.
- 81 - TETSU, O.; MCCORMICK, F. Beta-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature** (Lond.), v.398, p.422–426, 1999.
- 82 - MOLENAAR, M. et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. **Cell**, v.86, p.391–399, 1996.
- 83 - BEHRENS, J. et al. Functional interaction of b-catenin with the transcription factor LEF-1. **Nature**, v.382, p.638–642, 1996.
- 84 - ORFORD, K. et al. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of b-catenin. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.24735–24738, 1997.
- 85 - IKEDA, S. et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3b and beta-catenin and promotes GSK-3b-dependent phosphorylation of beta-catenin. **EMBO J.**, v.17, p.1371–1384, 1998.

- 86 - KORINEK, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a b-catenin-Tcf complex in APC2/2 colon carcinoma. **Science**, v.275, p.1784–1787, 1997.
- 87 - VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. **The Genetic Basis of Human Cancer**. New York: McGraw-Hill, Inc., 1998. p. 565–587.
- 88 - TAKAHASHI, M. ET AL. Beta-Catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. **Cancer Res.**, v.58, p.42–46, 1998.
- 89 - MORIN, P. et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science** (Washington DC), v.275, p.1787–1790, 1997.
- 90 - TAKAHASHI, M. ET AL. Beta-Catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. **Cancer Res.**, v.58, p.42–46, 1998.
- 91 - YAMADA, Y. ET AL. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.60, p.3323–3327, 2000.

- 92 – HATA, K. et al. Tumor formation is correlated with expression of beta-catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Cancer Sci.**, v.95(4), p.316-20, apr 2004.
- 93 – TAKAYAMA, T. et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **N Engl J Med.**, v.339, p.1277–84, 1998.
- 94 – TAKAHASHI, M. et al. Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase- 2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, p.1319–27, 2000.
- 95 – OCHIAI, M. et al. Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. **Am J Pathol**, v.163, p.1607–14, 2003.
- 96 - SIU, I.M. et al. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. **Cancer Res.**, v.59, p.63–66, 1999.
- 97 - HAO, X. et al. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. **Virchows Arch.**, v.431, p.167–172, 1997.

-
- 98 - BRABLETZ, T. et al. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. **Pathol. Res. Pract.**, v.194, p.701–704, 1998.
- 99 - IWAMOTO, M. et al. Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. **Carcinogenesis** (Lond.), v.21, p.1935–1940, 2000.
- 100 - VALIZADEH, A. et al. Expression of E-cadherin-associated molecules and beta-catenins and p120) in colorectal polyps. **Am. J. Pathol.**, v.150, p.1977–1984, 1997.
- 101 - HARDY, R. G. et al. Aberrant P-cadherin expression is an early event in hyperplastic and dysplastic transformation in the colon. **Gut**, v.50(4), p.513-9, apr 2002.
- 102 - PRETLOW, T. P.; BIRD, R. P. Correspondence: Y. Yamada et al., Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.60, p.3323–3327, 2000, and Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis.

- Cancer Res., v.61, p.1874–1878, 2001. **Cancer Res.**, v.61, p.7699–7700, 2001.
- 103 - POWELL, S. et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature** (Lond.), v.359, p.235–237, 1992.
- 104 - SPARKS, A. B. ET AL. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. **Cancer Res.**, v.58, p.1130–1134, 1998.
- 105 - SMITH, A. J. ET AL. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer Res.**, v.54, p.5527–5530, 1994.
- 106 - OTORI, K. et al. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. **Cancer** (Phila.), v.83, p.896–900, 1998.
- 107 - IWAMOTO, M. et al. Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. **Carcinogenesis** (Lond.), v.21, p.1935–1940, 2000.

- 108 - MEI, J. M. et al. Differential formation of beta-catenin/lymphoid enhancer factor-1 DNA binding complex induced by nitric oxide in mouse colonic epithelial cells differing in adenomatous polyposis coli (Apc) genotype. **Cancer Res.**, v.60, p.3379–3383, 2000.
- 109 - CAMERON, I.; GARZA, J.; HARDMAN, W. Distribution of lymphoid nodules, aberrant crypt foci and tumours in the colon of carcinogen-treated rats. **Br. J. Cancer**, v.73, p.893–898, 1996.
- 110 - TAKAHASHI, S. et al. Induction of aberrant crypt foci in the large intestine of F344 rats by oral administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.82, p.135–137, 1991.
- 111 – REDDY, B.S.; RAO, C.V.; SEIBERT, K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. **Cancer Res**, v.56, p.4566–9, 1996.
- 112 – ZHENG, Y. et al. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. **Carcinogenesis**, v.20, p.255–60, 1999.
- 113 – RAO, C.V. et al. Enhancement of experimental colon cancer by genistein. **Cancer Res**, v.57, p.3717–22, 1997.

- 114 – HIROSE, Y. et al. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.24, p.107–11, 2003.
- 115 – COLBERT, L.H. et al. Exercise and tumor development in a mouse predisposed to multiple intestinal adenomas. **Med Sci Sports Exerc**; v.32(10), p.1704-8, 2000.
- 116 – DEMARZO, M.M.; GARCIA, S.B. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. **Cancer Lett.** V.8, n.216(1), p.31-4, dec 2004.
- 117 - DAWSON, C.A.; HORVATH, S.M. Swimming in small laboratory animals. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.2, p.51–78, 1970.
- 118 – PAULSEN, J.E. et al. Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the Min/+ mouse colon. **Cancer Res**, v.61, p.5010–5, 2001.
- 119 – KUNO, T. et al. Induction of apoptosis by sulindac in azoxymethane-induced possible colonic premalignant lesions in rats. **Jpn J Cancer Res**, v.93, p.242–6, 2002.

- 120 – BUTTOW, N.C. et al. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. **Dig Dis Sci**, v.48(10), p.2069-76, oct 2003.
- 121 – KOHNO, H. et al. Dietary conjugated linolenic acid inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Jpn J Cancer Res.**, v.93(2), p.133-42, feb 2002.
- 122 – LAVEZZI, A.M.; TERNI, L.; MATTURRI, L. PCNA immunostaining as a valid alternative to tritiated thymidine-autoradiography to detect proliferative cell fraction in transitional cell bladder carcinomas. **In Vivo**, v.14(3), p.447-51, may 2000.
- 123 – SUZUKI, R. et al. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (Ginkgo biloba) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Cancer Lett.**, v.16, n.210(2), p.159-69, jul 2004.
- 124 – YAMADA, K. et al. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic colonic epithelium of the rat. **Gastroenterology**, v.103(1), p.160-7, jul 1992.

- 125 - FRIEDENREICH, C.M.; ORENSTEIN, M.R. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms, **J. Nutr.**, v.132, p.3456S–3464S, 2002.
- 126 - JI, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.222, p.283-292, 1999.
- 127 - DREHER, D.; JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur. J. Cancer**, v.32A, p.30-38, 1996.
- 128 - ALESSIO, H. M.; GOLDFARB; A. H.; CAO, G. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. **Int. J. Sport Nutr**, v.7, p.1-9, 1997.
- 129 - POULSEN, H. E.; LOFT, S.; VISTISEN, K. Extreme exercise and oxidative DNA modification. **J. Sports Sci**, v.14, p.343-346, 1996.
- 130 - KIDO, Y. et al. Japanese dietary protein allowance is sufficient for moderate physical exercise in young men. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** (Tokyo), v.43, p.59-71, 1997.
- 131 - ROBERTSON, J.D. et al. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci.** V.80, p.611-618, 1991.

- 132 - JI, L.L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. **Exerc. Sport Sci. Rev**, v.23, p.135-166, 1995.
- 133 - KRETZSCHMAR, M.; MULLER, D. Aging, training and exercise: a review of effects on plasma glutathione and lipid peroxides. **Sports Med**, v.15, p.196-209, 1993.
- 134 - LEROITH, D. et al. Insulin-like growth factors and cancer. **Ann. Intern Med.**, v.122, p.54-59, 1995.
- 135 - DEL GIUDICE, M.E. et al. Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.47, p.111-120, 1998.
- 136 - HU, F.B. et al. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.91, p.542-547, 1999.
- 137 - MOORE, M. A.; PARK, C. B.; TSUDA, H. Physical exercise: a pillar for cancer prevention? **Eur. J. Cancer Prev.**, v.7, p.177-193, 1998.
- 138 - BJORNTORP, P. Metabolic implications of body fat distribution. **Diabetes Care**, v.14, p.1132-1143, 1991.

- 139 - SIVERTSEN, I.; DAHLSTROM, A. W.. The relation of muscular activity to carcinoma: a preliminary report. **J. Cancer Res.**, V.6, p.365–378, 1922.
- 140 - KROTKIEWSKI, M. et al. Effects of physical training on insulin, connecting peptide (C- peptide), gastric inhibitory polypeptide (GIP) and pancreatic polypeptide (PP) levels in obese subjects. **Int. J. Obes**, v.8, p.193-199, 1984.
- 141 - REGENSTEINER, J.G. et al. Relationship between habitual physical activity and insulin levels among nondiabetic men and women. **San Luis Valley Diabetes Study. Diabetes Care**, v.14, p.1066-1074, 1991.
- 142 - COTTERILL, A.; HOLLY, J.; SAVAGE, M. Current status of the IGF's and their binding proteins. **Growth Matters**, v.9, p.7, 1992.
- 143 - WESTLEY, B.R.; MAY, F. E. Insulin-like growth factors: the unrecognised oncogenes. **Br. J. Cancer**, v.72, p.1065-1066, 1995.
- 144 - NGUYEN, U.N. et al. Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes. **Eur. J. Appl. Physiol**, v.78, p.533-537, 1998.

-
- 145 - SCHWARZ, A.J. et al. Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 a, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.81, p.3492-3497, 1996.
- 146 - ELIAKIM, A. et al. Increased physical activity and the growth hormone-IGF-I axis in adolescent males. **Am. J. Physiol**, v.275, p.R308-R314, 1998.
- 147 - NEWSHOLME, E.A.; PARRY-BILLINGS, M. Effects of exercise on the immune system. In: BOUCHARD, C.; SHEPHARD, R. J.; STEPHENS, T. (Eds.). **Physical Activity, Fitness, and Health: International Proceedings Consensus Statement**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1994, p. 451.
- 148 - SHEPHARD, R.J. et al. Physical activity and the immune system. **Can. J. Sport Sci**, v.16, p.169-185, 1991.
- 149 - BRINES, R.; HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B. K. Can you exercise to make your immune system fitter? **Immunol. Today**, v.17, p.252-254, 1996.

- 150 - NIEMAN, D.C. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.26, p.128-139, 1994.
- 151 - LINDA, M.; CASTELL, M.A. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition**, v.18, p.371–375, 2002.
- 152 - WESTERLIND, K.C. Physical Activity and Cancer Prevention-Mechanisms. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.35, n.11, p.1834-1840, 2003.
- 153 - WESTLEY, B.R.; MAY, F.E. Insulin-like growth factors: the unrecognised oncogenes. **Br. J. Cancer**, v.72, p.1065-1066, 1995.
- 154 - CERIN, E. et al. Levels of Physical Activity for Colon Cancer Prevention Compared with Generic Public Health Recommendations: Population Prevalence and Sociodemographic Correlates. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, vol.14, p.1000-1002, 2005.
- 155 - HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Third edition. New York: Oxford University Press Inc., 1999, p. 333.
- 156 – COOPER, K. H. **Dr. Kenneth H. Cooper's antioxidant revolution**. Second edition. Nashville: Thomas Nelson Publishers, 1994, p. 16.

Referências

* De acordo com:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas. Grupo DiTeses. Diretrizes para apresentação de Teses e Dissertações da USP. Funaro, Vânia M. B. O. coord. [et al.]. São Paulo, SIBI/USP, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Trabalho publicado.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters 216 (2004) 31–34

CANCER
Letters

www.elsevier.com/locate/canlet

Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen

Marcelo Marcos Piva Demarzo, Sérgio Britto Garcia*

Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, USP, 3900 Bandeirantes Avenue, 14049-000 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 29 December 2003; received in revised form 1 June 2004; accepted 2 June 2004

Abstract

Aberrant crypt foci (ACF) have been used for early detection of factors that influence colorectal carcinogenesis in rats. It has been observed that exhaustive exercise increases free radical DNA oxidative damage and depresses immune function, events also related to the increased risk for cancer development. Fifteen days after a single exhaustive swimming bout in untrained rats treated with a colon carcinogen, we observed a statistically significant increased number of ACF when compared to the non-exercised group. Thus, we concluded that exhaustive exercise increased the susceptibility for colon cancer in rats. From our finding and literature data, we hypothesize that, similarly to the suggested relationship between exercise and infections, exercise could be protective against cancer or it could increase the risk for this disease depending on its type, dose and duration.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Colon carcinogenesis; Rat; 1,2-Dimethylhydrazine; Exhaustive physical exercise; Aberrant crypt foci

1. Introduction

Carcinogenesis is a complex, multistep process, presumably involving a plethora of events occurring at the cellular, molecular, and morphological levels. The whole process can be divided into three main stages: initiation, promotion, and progression [1,2].

The aberrant crypt foci (ACF), first described by Bird in 1987 [3], have long been postulated to be

precursor lesions which develop into colorectal cancer [1,4]. ACF assays have been extensively used for detection of factors that influence early colorectal carcinogenesis modifiers in rats initiated with the chemical carcinogen 1,2-dimethylhydrazine (DMH) [5,6].

Evidence is accumulating that appropriate levels of physical exercises are associated with a reduced risk of some cancers. The evidence is most consistent for colon cancer, which is reduced by 40–50% among the most active individuals, compared with the least active. The effect is evident in men and women, and appears to be independent of

* Corresponding author. Tel.: +55-16-602-3180; fax: +55-16-633-1068.

E-mail address: sbgarcia@fmp.usp.br (S.B. Garcia).

0304-3835/\$ - see front matter © 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.canlet.2004.06.002

important confounding factors, such as obesity and type of diet [7–10].

Although regular physical exercise has many well-established health benefits [11–13], it has been observed that exhaustive exercise increases free radical DNA oxidative damage [11,14–16] and depresses immune function [17–20]. Both effects have also been related to increased risk for cancer development. Unaccustomed exhaustive physical exercise effects on cancer have been poorly discussed; thus, our aim was to verify the influence of exhaustive exercise on the colonic carcinogenesis in untrained rats treated with DMH.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Sixteen male Wistar rats, supplied by Ribeirão Preto School of Medicine 30 days after birth, were housed one or two per cage in a temperature-controlled room at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and maintained on a 12:12-h light–dark cycle. The rats were provided with the same diet, a commercial chow purchased from Ribeirão Preto School of Medicine, and tap water on an ad libitum basis. The animals were maintained in agreement with the guidelines of Committee on Care and Uses of Laboratory Animals of the National Research Council of the N.I.H. (USA).

2.2. Experimental design

The animals were randomly divided into exercise and control groups, with eight animals in each group. The exercise group was given one exhaustive swimming endurance test. This was assessed by forcing each rat to swim to exhaustion with a weight equivalent to 2% of body weight tied to the tail [11]. Exhaustion was defined, according to the criterion of Dawson and Horvath [21], which is at the point where the rats remained below the water surface for 10 s. Swimming was performed in a plastic container that was 100 cm high, filled to a depth of 60 cm with water, maintained at a temperature between 35 and 36 °C. During the exercise protocol, the control group animals were kept in a small chamber containing about 3 cm of water maintained at 35 °C [11].

2.3. Induction of preneoplastic lesions in colonic mucosa

The groups were given s.c. injections of DMH (50 mg/kg body weight; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) [22] immediately after been submitted to exhaustive exercise by swimming, as described elsewhere [11].

2.4. Morphological analysis

Fifteen days after neoplastic induction, rats were sacrificed [22]. At autopsy each entire colon was removed, opened longitudinally, and was fixed flat on a styrofoam board in 10% neutral buffered formalin for 24 h and then stained with 0.2% methylene blue [22]. The numbers of ACF were counted per microscopic field under low power magnification by light microscopy. The analysis was conducted blind with regard to the groups.

2.5. Statistical analysis

All quantitative data are presented as mean $\pm$ SD values. Numbers of ACF were analyzed by the Student's *t*-test.

3. Results

The average final body weights of rats in exercise and control groups were, respectively, 250 ± 12.5 and 250.3 ± 21.1 g (mean $\pm$ SD). ACF were observed in both groups. The number of foci in the exercise group was 10.85 ± 3.20 per microscopic field, and 3.72 ± 0.70 in the control group. The increased number of ACF in the exercise group was statistically significant ($P < 0.01$). The majority of ACF appeared in the middle and distal colon in both groups.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that a single bout of exhaustive exercise was associated with an increased number of colonic ACF in untrained rats treated with DMH, when compared to the control group animals. The mechanisms

underlying this finding remain to be clarified in detail. It is known that elevated oxidative stress and immune depression function could facilitate colon carcinogenesis. Despite the fact that regular physical exercise has many well-established health benefits [11–13], unaccustomed exhaustive physical exercise increases systemic free radical generation, which can modify several critical cellular components such as DNA, proteins, and membrane lipids, leading to tissue damage in experimental animals [11,14–16]. Excessive exercise also induces DNA damage in peripheral leukocytes [23]. Even forced exercise training, when compared to spontaneous exercise, leads to an increased level of oxidative DNA damage in rats [15]. It has been suggested that oxidative stress to DNA points to a risk for the development of cancer from extreme exercise [24]. Furthermore, it is well-established that various forms of physical exertion or physical stress, including exhaustive exercise have been associated with depressed immune function, which could also promote neoplastic development [17–19]. In sedentary adults strength exercises can induce a transient decrease in natural killer cell counts, which usually play an important role against cancer cells [25].

It is known that moderate regular exercise training is associated to a reduced incidence of colon cancer in humans and animals [10]. On the other hand, in this study, we showed that exhaustive physical exercise may be related to an increased susceptibility to develop colonic ACF in untrained rats. Interestingly, there is a resemblance to a suggested relationship between exercise and infections by Nieman [20,26]. This author has suggested that the incidence of infection can be decreased with moderate exercise but increases sharply in individuals who undertake excessive amounts of exercise.

From our data it is only possible to conclude that exhaustive exercise increased the susceptibility for colon cancer in rats. Our finding lead us to hypothesize that, similarly to the suggested relationship between exercise and infections [26], exercise could be protective against cancer or it could increase the risk for this disease depending on its type, dose and duration. Thus, more studies are warrant to refine the understanding of the complex relation between exercise and cancer.

Acknowledgements

Part of this work was supported by CAPES, CNPq and FAPESP. The authors would like to thank Mrs R.O. Lopes, Mrs F. Martinello and Mrs A. Crescenzi for technical support, and Mrs Roselyne Lesur for the correction to the English language.

References

- [1] R.P. Bird, Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer, *Cancer Lett.* 93 (1995) 55–71.
- [2] R. Fodde, The APC gene in colorectal cancer, *Eur. J. Cancer* 38 (2002) 867–871.
- [3] R.P. Bird, Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, *Cancer Lett.* 37 (1987) 147–151.
- [4] N. Shivapurkar, L. Huang, B. Ruggeri, P.A. Swalsky, A. Balicer, S. Finkelstein, et al., K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients, *Cancer Lett.* 115 (1997) 39–46.
- [5] E.A. McLellan, A. Medline, R. Bird, Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon, *Carcinogenesis* 12 (1991) 2093–2098.
- [6] I. Thorup, O. Meyer, E. Kristiansen, Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats, *Nutr. Cancer* 21 (1994) 177–182.
- [7] L.D. Marrett, B. Theis, F.D. Ashbury, Workshop report: physical activity and cancer prevention, *Chronic Dis. Can.* 21 (2000) 143–149.
- [8] A.E. Hardman, Physical activity and cancer risk, *Proc. Nutr. Soc.* 60 (2001) 107–113.
- [9] D.S. Alberts, Reducing the risk of colorectal cancer by intervening in the process of carcinogenesis: a status report, *Cancer J.* 8 (2002) 208–221.
- [10] C.M. Friedenreich, M.R. Orenstein, Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms, *J. Nutr.* 132 (2002) 3456S–3464S.
- [11] P. Venditti, S. Di Meo, Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 331 (1996) 63–68.
- [12] C.M. Andies, Exercise, cachexia, and cancer therapy: a molecular rationale, *Nutr. Cancer* 42 (2002) 143–157.
- [13] C.A. Macera, J.M. Hootman, J.E. Sniezek, Major public health benefits of physical activity, *Arthritis Rheum.* 49 (2003) 122–128.
- [14] A.K. Banerjee, A. Mandal, D. Chanda, S. Chakraborti, Oxidant, antioxidant and physical exercise, *Mol. Cell. Biochem.* 307 (2003) 307–312.
- [15] S. Asami, T. Hirano, R. Yamaguchi, Y. Tsurudome, H. Itoh, H. Kasai, Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998) 678–682.

- [16] H.E. Poulsen, A. Weimann, S. Loft, Methods to detect DNA damage by free radicals: relation to exercise, *Proc. Nutr. Soc.* 58 (1999) 1007–1014.
- [17] R.R. Jenkins, Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review, *Int. J. Sport Nutr.* 3 (1993) 356–375.
- [18] M.P. Mahan, M.R. Young, Immune parameters of untrained or exercise-trained rats after exhaustive exercise, *J. Appl. Physiol.* 66 (1989) 282–287.
- [19] R.J. Shephard, P.N. Shek, Effects of exercise and training on natural killer cell counts and cytolytic activity: a meta-analysis, *Sports Med.* 28 (1999) 177–195.
- [20] M. Linda, M.A. Castell, Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise?, *Nutrition* 18 (2002) 371–375.
- [21] C.A. Dawson, S.M. Horvath, Swimming in small laboratory animals, *Med. Sci. Sports Exerc.* 2 (1970) 51–78.
- [22] H.S. Park, R.A. Goodlad, N.A. Wright, The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology, *Cancer Res.* 57 (1997) 4507–4510.
- [23] E. Fehrenbach, H. Nothoff, Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins, *Exerc. Immunol. Rev.* 7 (2001) 66–89.
- [24] H.E. Poulsen, S. Loft, K. Vistisen, Extreme exercise and oxidative DNA modification, *J. Sports Sci.* 14 (1996) 343–346.
- [25] S. Berman, P. Philip, M. Candito, P. Ferrati, C. Dolisi, Effects of strength exercise and training on the natural killer cell counts in elderly humans, *J. Sports Med. Phys. Fitness* 41 (2001) 196–202.
- [26] D.C. Nieman, Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system, *Med. Sci. Sports Exerc.* 26 (1994) 128–139.

ANEXOS

TABELA 1 – Média do número de células marcadas positivamente pelo PCNA por cripta por animal, em relação à média do número total de células por cripta nos animais dos grupos I a VII.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo IV	Grupo VI	Grupo VII
1	23/140	22/154	16/150	58/174	46/168	28/150	36/152
2	20/134	20/150	18/146	56/162	58/172	32/152	28/148
3	24/142	16/148	26/148	54/172	54/168	32/150	28/156
4	20/152	24/150	22/148	62/186	58/170	30/152	26/144
5	16/148	18/148	22/150	48/174	50/172	32/148	34/150
6	22/140	18/150	24/154	56/168	54/168	28/152	32/152
7	18/142	20/148	16/150	52/170	48/164	34/148	30/152
8	16/136	22/148	20/150	54/166	50/172	30/148	32/152

TABELA 2 – Índices médios de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) para cada animal dos grupos de I a VII.

Animal	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo IV	Grupo VI	Grupo VII
1	0,164	0,142	0,106	0,333	0,273	0,186	0,236
2	0,149	0,133	0,123	0,345	0,337	0,210	0,189
3	0,169	0,108	0,175	0,313	0,321	0,213	0,179
4	0,131	0,160	0,148	0,340	0,341	0,197	0,180
5	0,108	0,121	0,146	0,275	0,290	0,216	0,226
6	0,157	0,120	0,155	0,333	0,321	0,184	0,210
7	0,126	0,135	0,106	0,305	0,292	0,229	0,197
8	0,117	0,148	0,133	0,325	0,290	0,202	0,210

TABELA 3 – Índices médios de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA), e os respectivos desvios-padrões (SD), nos grupos de I a VII.

Grupo	iPCNA±SD
I	0,1401±0,02273
II	0,1334±0,01680
III	0,1356±0,02421
IV	0,3211±0,02292
V	0,3081±0,02506
VI	0,2046±0,01540
VII	0,2034±0,02088

TABELA 4 - Média do número de FCAs/cm² por animal, e média do número de FCAs/cm² e respectivos desvios-padrões por grupo, contados 30 campos microscópicos.

Animal	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
1	3,4	8,6	1,8	3,7
2	3,1	7,4	1,7	3,3
3	4,0	8,9	1,8	3,5
4	3,8	9,2	2,1	4,2
5	4,1	7,9	1,6	3,6
6	3,0	8,0	1,7	2,9
7	3,1	7,8	1,4	4,4
8	3,9	9,2	2,1	3,0
Média±SD	3,550±0,4504	8,375±0,6902	1,775±0,2375	3,575±0,5285

Observação: nos grupos I a III não houve aparecimento de FCAs.

TABELA 5 – Média do número de CABC em relação ao número total de criptas por animal, contados 30 campos microscópicos, e iCABC médios por grupo, e seus respectivos desvios-padrões.

Animal	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
1	10/125	7/100	2/100	5/250
2	12/250	11/125	4/175	7/175
3	5/100	5/75	3/175	6/250
4	9/175	4/50	1/75	3/100
5	6/150	7/100	5/125	2/100
6	5/100	8/75	2/175	7/100
iCABC	0,0531±0,01375	0,0800±0,01507	0,0205±0,01041	0,0340±0,01918

Observação: nos grupos I a III não houve aparecimento de CABC.