UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

ANDERSON VULCZAK

Exercício físico aeróbico de intensidade moderada reduz a velocidade de crescimento e modula o metabolismo energético tumoral em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo

RIBEIRÃO PRETO
2018

ANDERSON VULCZAK

Exercício físico aeróbico de intensidade moderada reduz a velocidade de crescimento e modula o metabolismo energético tumoral em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Orientadora: Dr^a Gabriela Silva Bisson

Co-Orientadora: Dr^a Luciane Carla Alberici

RIBEIRÃO PRETO
2018

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.

Vulczak, Anderson

Exercício físico aeróbico de intensidade moderada reduz a velocidade de crescimento e modula o metabolismo energético tumoral em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo. Ribeirão Preto, 2018.

95 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem em Saúde Pública.

Orientador: Gabriela Silva Bisson

Coorientador: Luciane Carla Alberici

1. Exercício Físico. 2. Câncer de Mama. 3. Mitocôndrias. 4. OXPHOS. 5. Metabolismo Tumoral.

VULCZAK, Anderson

Exercício físico aeróbico de intensidade moderada reduz a velocidade de crescimento e modula o metabolismo energético tumoral em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovado em: 12/12/2018.

Comissão Julgadora

Prof. Dr^a. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

Prof. Dr. Tiago Rezende Figueira

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr^a. Maria José Alves da Rocha

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Nelson e Renilda, por todo estímulo à aprendizagem e conhecimento, sobretudo, pela minha formação como ser humano.

“...é sempre bom saber um pouco de cada coisa!” me diziam quando criança. Talvez tenha levado à sério demais a frase, mas o dia que não aprendo nada, para mim, é um dia desperdiçado.

À minha irmã Mônica e meu cunhado Diego, pelo companheirismo e conversas sempre agradáveis.

Dedico também este trabalho a todas as mulheres, em especial àquelas diagnosticadas com câncer de mama. Mulheres fortes, guerreiras e que mesmo diante desta batalha, são mães, companheiras enamoradas, amigas e mantêm sua graça, delicadeza e amor!

Obrigado pelo exemplo de humanidade!

AGRADECIMENTOS

Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar onde quer.

(Confúcio)

Gosto de pensar que Ciência é mar aberto...

No qual navegamos com a ambição da descoberta.

Mas a navegação exige chegadas e partidas...

É assim que vejo o agora, o momento de içar velas e navegar águas desconhecidas novamente, tendo agora na bagagem, aquilo que vocês gentilmente compartilharam comigo. Então, o meu muito obrigado...

...à **Silvano Coutinho e Tatiane Veiga**, por acreditarem em mim e terem orientado à direção que deveria aprumar as velas do meu barco para aqui atracar.

Obrigado também à **Prof^a. Gabriela Bisson** pela oportunidade!

A terra firme que cheguei não é livre de tempestades e furacões...

Mas, em meio ao turbilhão encontrei abrigos seguros e prósperos! O meu sincero, cordial e profundo agradecimento a minha co-orientadora **Prof^a. Luciane Carla Alberici**, por ter me abrigado em seu laboratório, sobretudo, pelo apoio incondicional que deu ao longo desta jornada.

Meu agradecimento especial à **Shirley Figueiredo** e ao **Prof. Pedro Palha**, por todo suporte nos momentos difíceis desta caminhada. Muito obrigado!

Agradeço também à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, ao Programa de Pós Graduação de Enfermagem em Saúde Pública, em particular à coordenadora **Prof^a. Ione**, também à **Clara, Kethleen, Flávia** e todos os demais funcionários, sempre atenciosos e dispostos a ajudar! Aos também sempre amigáveis, alegres e simpáticos São Chiquinho e o querido Odilon (*In memoriam*).

As companheiras e companheiros do Laboratório de Genômica e Imunobiologia - LGBio, por todas as conversas, comidas, cafés, sobretudo, por terem colaborado com minha formação. Obrigado, **Denise Sayuri, Luciana Veronez, Jéssica Santos, Luiz Carlos Jr., Isabela Daher e Andressa Fisch.**

Muito obrigado também à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Departamento de Físico-Química, meu ancoradouro nesses últimos dois anos. Meu abraço cordial e carinhoso a toda equipe do Grupo de Análises do Metabolismo Mitocondrial e Exercício - GAME, por todos os momentos vivenciados. Muito obrigado, **prof^a. Carem, Anderson, Carlos Dechandt, Jonathas, Carlos Couto, Igor, Simone, Gustavo, Henrique, Rute e Julia!**

Agradeço também ao **Carlos A. Sorgi, Lúcia H. Faccioli e Viviani N. Takahashi** do Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios - (CEQIL) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por todo apoio no desenvolvimento de parcerias científicas. Sobretudo, pela oportunidade ímpar de crescimento profissional!

Também aos sempre dispostos a colaborar, ensinar, cooperar e contribuir com a formação de todos nós, o meu sincero agradecimento por toda ajuda e suporte que particularmente me ofereceram neste tempo: o **Sêo Alcides**, a **Ana Elisa (Aninha)**, **Lu Angulo**, **Cris Bernardelli** e também a **Cris Polizello**. Muito Obrigado!

Meu agradecimento à professora **Bia, Odônio** e à **Dona Tilde**, pelos momentos agradáveis e ótimas conversas! Ciência, Política, Educação, churrasco... Até carnaval me fizeram pular... (logo eu)!

O meu mais sincero agradecimento também à **Professora Majô**, por toda ajuda e colaboração. Sobretudo, pelo estímulo e motivação para que eu continue a navegar neste mar de Ciências! Obrigado!

Durante o tempo que estive ancorado neste porto, todos vocês direta ou indiretamente colaboraram não apenas para a elaboração deste trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal e formação profissional. Agora, na minha bagagem levarei também um pouco de vocês comigo. É hora de partir, levantar âncoras, içar velas, alinhar mastros e desbravar outros mares!

Sou grato a Deus por todos vocês terem feito parte da minha jornada!

Scientia vincet

Este trabalho foi financiado inicialmente e parcialmente
por verba própria, da minha reserva econômica
particular.

Outra parte da pesquisa foi realizada com verba de
auxílio PROEX/Capes (EERP-USP). Conforme
PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018.

*"O presente trabalho foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".*

Outra parte foi desenvolvida com recursos do
Laboratório de Metabolismo Mitocondrial e Exercício
(FCFRP-USP).

*Quem come do fruto do conhecimento, é
sempre expulso de algum paraíso.*

Melanie Klein

RESUMO

VULCZAK, Anderson. **Exercício físico aeróbico de intensidade moderada reduz a velocidade de crescimento e modula o metabolismo energético tumoral em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo.** 2018. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - Centro Colaborador da OPAS/OMS para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem, Ribeirão Preto, 2018.

O câncer de mama ocupa o primeiro lugar em mortalidade dentre todos os tipos de câncer. O subtipo triplo-negativo (*triple-negative breast cancer* - TNBC) representa 15-20% de todos os tipos de câncer de mama com alta prevalência em mulheres pré-menopausa e destaca-se pelo seu grande tamanho tumoral e agressividade no estabelecimento de metástases, com impacto direto na redução da sobrevida dos pacientes. Apesar das evidências sobre os efeitos anti-tumorigênicos do exercício físico, tanto na prevenção como durante a carcinogênese, é comum que pacientes alterem sua rotina após o diagnóstico de câncer, frequentemente reduzindo as atividades físicas durante e após o tratamento. Em adição, os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce papel anti-tumoral são pouco compreendidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico moderado em modelo experimental de câncer de mama de tipo triplo-negativo, com ênfase na modulação do metabolismo energético tumoral. Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c em desenho experimental de 12 semanas, cuja inoculação de 1×10^4 células 4T1 foi realizada após 8 semanas de treinamento. Após protocolo de exercício aeróbico moderado em esteira, foram realizadas análises do metabolismo mitocondrial tumoral, composição lipídica e expressão de genes relacionados à bioenergética e proliferação celular. Os resultados mostraram que o exercício aeróbico moderado reduziu 54,5% do volume e 42% da massa tumoral de animais que foram treinados antes e após a inoculação tumoral. Animais treinados apresentaram fosforilação oxidativa mais próxima ao seu limite máximo respiratório e menor respiração mitocondrial no tecido tumoral quando comparados ao grupo sedentário. O treinamento ocasionou redução no conteúdo de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina. Enquanto a análise de expressão relativa de mRNA demonstrou aumento na expressão de genes relacionados à via metabólica glicolítica, como Hif1a, Glut-1, HKII, Ldha e Pdk, além dos supressores tumorais p53 e Lats2. Nossos resultados sugerem que a redução na velocidade de crescimento tumoral proporcionada pelo exercício físico aeróbico de carga moderada seja devida, pelo menos em parte, à modulação do metabolismo energético tumoral. Em conjunto, os dados do nosso estudo abrem novas perspectivas para a identificação de vias metabólicas sensíveis ao exercício físico, permitindo o melhor o entendimento de seus efeitos anti-tumorigênicos.

Palavras-Chave: 1. Exercício Físico. 2. Câncer de Mama. 3. Mitocôndria. 4. OXPHOS
5. Metabolismo Tumoral.

ABSTRACT

VULCZAK, Anderson. **Moderate-intensity aerobic physical exercise reduces tumor growth velocity and modulates tumor energy metabolism in the experimental model of triple-negative breast cancer.** 2018. 95 f. Thesis (Ph.D. in Sciences) - *University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing* - PAHO/WHO Collaborating Centre for Nursing Research Development, Ribeirão Preto, 2018.

Breast cancer ranks first in mortality among all types of cancer. The triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 15-20% of all types of breast cancer with a high prevalence in premenopausal women and is notable for its large tumor size and aggressiveness in the establishment of metastasis, with a direct impact on the reduction of patients' survival. Although evidence highlight the anti-tumorigenic effects of physical exercise both on the prevention as well as during carcinogenesis, patients commonly change their routine after cancer diagnostic, usually reducing physical activity during and after treatment. Moreover, the mechanisms underlying the anti-tumor role of physical exercise remain poorly understood. The objective of this study was to evaluate the effects of moderate aerobic physical exercise in an experimental model of triple-negative breast cancer, with emphasis on the modulation of tumor energy metabolism. Female BALB / c mice were used in a 12-week experimental design, whose inoculation of 1×10^4 4T1 cells was performed after 8 weeks of training. After the protocol of moderate aerobic exercise was carried out on the treadmill, analyzes of mitochondrial tumor metabolism, lipid content and qPCR of genes related to bioenergetics and tumorigenic process were performed. The results showed that moderate aerobic exercise reduced 54.5% of the volume and 42% the tumor mass of animals trained before and after tumor inoculation. Trained animals showed oxidative phosphorylation closest to the maximum respiratory limit and lower mitochondrial respiration in tumor tissue when compared to the sedentary group. The training resulted in a reduction in the content of phosphatidic acid and phosphatidylcholine. In the trained group, relative mRNA quantification analysis showed increased expression of genes related to the glycolytic metabolic pathway, such as Hif1a, Glut-1, HKII, Ldha, and Pdk, as well as of the tumor suppressors p53 and Lats2. Our results suggest that the reduction in tumor growth velocity provided by moderate-intensity aerobic physical exercise is due, at least in part, to the modulation of tumor energy metabolism. Together, data from our study open new perspectives for the identification of metabolic pathways sensitive to exercise, allowing better understanding of its anti-tumorigenic effects.

Key words: 1. Physical Exercise. 2. Breast Cancer. 3. Mitochondria. 4. Tumor Metabolism. 5. OXPHOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2HG	2-hidroxiglutarato (<i>2-hydroxyglutarate</i>)
ACC	Acetil-CoA carboxilase (<i>Acetyl CoA carboxylase</i>)
ADP	Difosfato de adenosina (<i>Adenosine diphosphate</i>)
Akt	Proteína quinase B (<i>Protein Kinase B</i>)
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
ATP	Trifosfato de adenosine (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BIOPS	Solução para preservação de biópsia (<i>Biopsy preservation solution</i>)
BSA	Albumina do soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CAF	Fibroblastos associados ao câncer (<i>Cancer-associated fibroblasts</i>)
CD8⁺	Linfócito T citotóxico (<i>Cytotoxic T cells</i>)
CDK8	Quinase dependente de ciclina 8 (<i>Cyclin-dependent kinase 8</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>Complementary DNA</i>)
CL	Cardiolipina (<i>Cardiolipin</i>)
c-Myc	Oncogene mielocitomatose (<i>Myelocytomatosis oncogene</i>)
DAG	Diacilglicerol (<i>Diacylglycerols</i>)
DNA	Ácido <i>desoxirribonucleico</i> (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DRP1	Proteína relacionada à dinamina 1 (<i>Dynamin related protein 1</i>)
DTNB	Reagente de Ellman (<i>Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))</i>)
DTT	Ditiotreitol (<i>DL-Dithiothreitol</i>)
E	Capacidade do sistema de transferência de elétrons (<i>Electron transfer system capacity</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
EGTA	Ácido egtálico (<i>Egtazic acid</i>)
EMT	Transição epitelial-mesenquimal (<i>Epithelial–mesenchymal transition</i>)
ER	Receptor de estrógeno (<i>Estrogen receptor</i>)
ETC	Cadeia de transporte de elétrons (<i>Electron transport chain</i>)
FFA	Ácidos graxos livres (<i>Free Fatty Acid</i>)
FH	Fumarato hidratase (<i>Fumarate hydratase</i>)
Fis1	Fissão mitocondrial 1 (<i>Mitochondrial fission 1 protein</i>)

GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
Gls	Glutaminase (<i>Glutaminase</i>)
Glut	Transportador de glicose (<i>Glucose transporter</i>)
HEPES	Sódico-ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1 Sal Sódico (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>)
Hif	Fatores induzidos por hipoxia (<i>Hypoxia-inducible factors</i>)
HKII	Hexoquinase II (<i>Hexokinase II</i>)
IDH	Isocitrato desidrogenase (<i>Isocitrate dehydrogenase</i>)
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina (<i>Insulin-like growth factor</i>)
Igf1r	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (<i>Insulin-like growth factor receptor 1</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IRS1	Receptor de insulina (<i>Insulin receptor</i>)
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico (<i>Monopotassium phosphate</i>)
K-RAS	Oncogene <i>Kirsten rat sarcoma</i> (<i>Kirsten rat sarcoma</i>)
L	Vazamento de prótons (<i>Protons LEAK</i>)
Lats	Grande supressor tumoral (<i>Large tumor suppressor kinase</i>)
LDH	Lactato desidrogenase (<i>Lactate dehydrogenase</i>)
LKB1	Supressor tumoral quinase B1 do fígado (<i>Tumor suppressor liver kinase B1</i>)
MAG	Monoacilgliceróis (<i>Monoacylglycerols</i>)
Mct	Transportadores de monocarboxilato (<i>Monocarboxylate transportes</i>)
MDM2	Proteína Mdm2 - regulador negativo de p53 (<i>Mouse double minute 2 homolog</i>)
Me	Enzima málica (<i>Malic enzyme</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio (<i>Magnesium chloride</i>)
MiR05	Meio para respiração mitocondrial (<i>Mitochondrial respiration medium</i>)
Mfn1	Mitofusina 1 (<i>Mitofusin 1</i>)
Mfn2	Mitofusina 2 (<i>Mitofusin 2</i>)
mRNA	RNA mensageiro (<i>Messenger RNA</i>)
mtDNA	DNA mitocondrial (<i>Mitochondrial DNA</i>)
Mtor	Alvo mamífero da rapamicina (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)

Mtp18	Proteína do processo de fissão mitocondrial 1 (<i>Mitochondrial fission process 1</i>)
mut-mtDNA	Proteína mutada do DNA mitocondrial (<i>Mitochondrial DNA mutated</i>)
mut-p53	Supressor tumoral p53 mutado (<i>Tumor suppressor p53 mutated</i>)
NaCl	Cloreto de sódio (<i>Sodium chloride</i>)
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) reduzida
NK	Exterminadores Naturais (<i>Natural Killer</i>)
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
Opa1	Proteína atrofia óptica 1 (<i>Optic atrophy 1</i>)
OXPHOS	Fosforilação oxidativa (<i>Oxidative phosphorylation</i>)
P	Capacidade de OXPHOS (<i>OXPHOS capacity</i>)
p53	Supressor tumoral p53 (<i>Tumour protein p53</i>)
PA	Ácido fosfatídico (<i>Phosphatidyl Acid</i>)
PARP	Polimerase poli (ADP-ribose) (<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PC	Fosfatidilcolina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PCR	Reação em cadeia da polymerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Pdh	Piruvato-desidrogenase (<i>Pyruvate dehydrogenase</i>)
Pdk	Piruvato-desidrogenase quinase (<i>Pyruvate dehydrogenase kinase</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PFKFB	Fosfofrutoquinase (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase)
PG	Fosfatidilglicerol (<i>Phosphatidylglycerol</i>)
PGC-1α	Co-ativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)
PI	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases (<i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i>)
PIP	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>)
PR	Receptor de progesterona (<i>Progesterone receptor</i>)

PS	Fosfatidilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
Pten	Fosfatase e homólogo de tensina (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
qPCR	PCR em tempo real (<i>Real time PCR</i>)
R	Respiração basal de rotina (<i>Basal-Routine</i>)
RIPA	Radioimunoensaio de precipitação - tampão de lise (<i>Radio immuno precipitation assay - lysis buffer</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
ROx	Oxigênio residual (<i>Residual oxygen</i>)
RQ	Coeficiente respiratório (<i>Respiratory quociente</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
S	Respiração mitocondrial estimulada com substratos
SDH	Succinato desidrogenase (<i>Succinate dehydrogenase</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SM	Esfingomielina (<i>Sphingomyelin</i>)
TAG	Triacilgliceróis (<i>Triacylglycerols</i>)
Taz	Domínio WW <i>contendo</i> regulador de transcrição 1 (<i>WW domain containing transcription regulator 1</i>)
TEAD	Fatores de transcrição do domínio TEA (<i>Transcription factors of the TEA domain</i>)
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico (<i>Tricarboxylic acid cycle</i>)
TME	Microambiente tumoral (<i>Tumor microenvironment</i>)
TNBC	Câncer de mama triplo negativo (<i>Triple-negative breast cancer</i>)
Tris-HCl	Trisaminometano- ácido clorídrico (<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>)
VCO₂	Volume de gás carbônico produzido
VEGFR	Receptor do fator de crescimento vascular endothelial (<i>Receptors for vascular endothelial growth fator</i>)
VO₂	Volume de oxigênio consumido
Yap	Proteína Yes-associada – co-ativador transcricional (<i>Yes-associated protein</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral de vias metabólicas ativas durante o Efeito Warburg.	16
Figura 2 - Via de Sinalização Hippo.	18
Figura 3 - Modelo de “Ondas de Transformações” do metabolismo tumoral durante a tumorigênese.	25
Figura 4 - Desenho experimental	29
Figura 5 - Exercício físico aeróbico moderado reduz a velocidade de crescimento tumoral em animais portadores de tumor de mama (4T1).	39
Figura 6 - Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre o tamanho e massa tumorais e sobre a massa corporal de animais portadores de tumores de mama (4T1).	40
Figura 7 - Exercício físico aeróbico moderado reduz a massa do baço e massa pulmonar de animais portadores de tumores de mama (4T1).	41
Figura 8 - Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre a respiração e controle do fluxo de oxigênio mitocondrial do tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	43
Figura 9 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes relacionados à dinâmica mitocondrial no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	44
Figura 10 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes relacionados ao metabolismo energético no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	45
Figura 11 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes relacionados à tumorigênese.	46
Figura 12 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes de receptores de crescimento celular e angiogênese no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	46
Figura 13 - Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre a respiração mitocondrial de células mononucleares do baço de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	47
Figura 14 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes da via Hippo Signaling no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	48
Figura 15 - Concentração de ácidos graxos quantificados no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	48
Figura 16 - Concentração de fosfolipídios quantificados no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	49
Figura 17 - Concentração de fosfatidilinositol-fosfato quantificados no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).	49
Figura 18 - Exercício físico aeróbico moderado reduz alterações morfológicas no tecido pulmonar de animais portadores de câncer de mama metastático (4T1).	50
Figura 19 - Exercício Físico aeróbico moderado reduz o desenvolvimento tumoral em TNBC (4T1).	67

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - Lista de Primer's utilizadas nas reações de PCR..... 35

Tabela 1 - Avaliação do quociente respiratório por calorimetria indireta (24h). 42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
<i>Câncer de Mama</i>	10
<i>Exercício Físico e Câncer de Mama</i>	12
<i>Microambiente Tumoral</i>	14
<i>Metabolismo Mitocondrial e Tumorigênese</i>	20
OBJETIVOS	26
<i>Objetivo Geral</i>	27
<i>Objetivos Específicos</i>	27
MATERIAIS E MÉTODOS	28
<i>Animais</i>	29
<i>Grupos Experimentais</i>	29
<i>Protocolo de Exercício Físico</i>	30
<i>Cultura Celular e Inoculação</i>	30
<i>Calorimetria Indireta</i>	30
<i>Sacrifício e Extração Tecidual</i>	31
<i>Separação de Células Mononucleares do Baço</i>	31
<i>Oximetria Células Mononucleares do Baço</i>	32
<i>Taxas Respiratórias das Células Mononucleares do Baço</i>	32
<i>Oximetria Tumoral</i>	32
<i>Permeabilização de Biópsias Tumorais</i>	32
<i>Taxas Respiratórias de Biópsias Tumorais</i>	32
<i>Ensaio de Atividade da Citrato Sintase</i>	33
<i>Histologia Pulmonar</i>	33
<i>Expressão de RNA</i>	33
<i>Extração de RNA</i>	33
<i>Conversão de cDNA</i>	34
<i>Análise da Expressão Relativa de mRNA (qPCR)</i>	34
<i>Extração de Lipídios</i>	36
<i>Análise lipídica por espectrometria de massa Tandem</i>	36
<i>Análise Estatística</i>	37
RESULTADOS.....	38
<i>Efeitos do Exercício Físico Aeróbico Moderado em Modelo Experimental de Câncer de Mama Triplo-Negativo</i>	39

<i>Exercício físico aeróbico moderado reduz a velocidade de crescimento tumoral em modelo experimental de TNBC</i>	<i>39</i>
<i>O metabolismo energético corporal é alterado durante a tumorigênese em modelo experimental de TNBC.....</i>	<i>42</i>
<i>Exercício físico aeróbico moderado modula a bioenergética tumoral para fenótipo glicolítico em modelo experimental de TNBC</i>	<i>43</i>
<i>Exercício físico aeróbico moderado modulou a respiração mitocondrial de células mononucleares do baço em modelo experimental de TNBC</i>	<i>47</i>
<i>Exercício físico aeróbico moderado aumentou a expressão de mRNA de gene supressor tumoral relacionado a via Hippo e atenuou alterações morfológicas no pulmão em modelo experimental de TNBC.....</i>	<i>47</i>
<i>Exercício físico aeróbico moderado reduziu a concentração de fosfolípídios em modelo experimental de TNBC.....</i>	<i>48</i>
DISCUSSÃO.....	51
<i>Impacto do Exercício Físico Aeróbico sobre o Volume e Massa Tumoral</i>	<i>52</i>
<i>Exercício Físico Aeróbico Moderado e Metabolismo Mitocondrial no TNBC.....</i>	<i>55</i>
<i>Transformação Tumoral do TNBC e Exercício Físico Aeróbico Moderado</i>	<i>58</i>
<i>Conteúdo lipídico do TNBC e Exercício Físico Aeróbico Moderado</i>	<i>62</i>
<i>Exercício Físico Aeróbico e Via Hippo.....</i>	<i>63</i>
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

Câncer de Mama

A estimativa global de câncer em todo o mundo, conforme dados da Organização Mundial de Saúde / GLOBOCAN 2018, independentemente do sexo, aponta o câncer de mama como a neoplasia mais prevalente, superior a 6,8 milhões de casos, equivalente à 15,7% de todos os casos de câncer no mundo (WHO, 2018). Em mulheres o câncer de mama ocupa o primeiro lugar em mortalidade dentre todos os tipos de câncer e a estimativa de incidência para 2018 é de mais de dois milhões de novos casos em âmbito mundial (Bray *et al.*, 2018). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que em 2018 ocorram 59.700 novos casos de câncer de mama em mulheres e mais de 14 mil mortes relacionadas (INCA, 2018). Entretanto, a Organização Mundial de Saúde a partir de dados da GLOBOCAN 2018, indica números ainda maiores para o Brasil com relação ao câncer de mama, cuja incidência estimada é de 85.620 novos casos com 18.442 mortes em 2018, além de ter a maior prevalência dentre os tipos de câncer nos últimos cinco anos, com 262.226 casos (WHO, 2018).

Dados epidemiológicos têm apontado como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama a menarca precoce, nulidade, uso de anticoncepcionais orais, primeira gestação em idade mais jovem, menor tempo de amamentação, menopausa tardia e a terapia de reposição hormonal, além de histórico familiar (Barnard *et al.*, 2015). Evidências demonstram que o estilo de vida é fator primordial como estratégia de prevenção contra o câncer de mama, cuja incidência aumenta com baixos índices de atividade física, sobrepeso e obesidade, consumo de álcool e tabaco (Harvie *et al.*, 2015; Katzke *et al.*, 2015), além de estresse psicológico (Kruk, 2014).

Em relação a aspectos clínicos e morfológicos, o câncer de mama é considerado uma doença heterogênea. A maioria dos tumores de mama origina-se no epitélio ductal (cerca de 80%) e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo. No entanto, existem ainda outros subtipos de carcinomas que podem ser diagnosticados, como o lobular, o tubular, o mucinoso, o medular, o micropapilar e o papilar (INCA, 2018). Apesar de investigações apontarem para vários subtipos, métodos atuais de classificação do câncer de mama agrupam tumores em quatro subtipos intrínsecos geneticamente e molecularmente como câncer luminal A (baixa proliferação), luminal B (alta proliferação), super-expressão do fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (HER2), chamado também de HER2-*overexpressing*, e o *basal-like*, que expressa marcadores similares às células basais, é resistente à terapia endócrina e possui alta capacidade proliferativa (Yeo e Guan, 2017).

Embora haja discussão na literatura sobre a classificação mais adequada, o tipo *basal-like* por vezes é nomeado equivocadamente de triplo-negativo (Aysola *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2017; Yeo e Guan, 2017; Barbosa *et al.*, 2018). É importante esclarecer que o câncer de mama triplo negativo (*triple-negative breast cancer* - TNBC) é um termo baseado em ensaios clínicos de imunohistoquímica para receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) e HER2, enquanto o *basal-like* é um fenótipo molecular inicialmente definido usando *microarrays* de cDNA. Adicionalmente, a maioria dos TNBC podem ser classificados dentro de um subgrupo *basal-like*, porém, esses termos não são sinônimos devido à ocorrência de discordância em torno de 30% entre os dois subgrupos (Anders e Carey, 2008).

Os receptores hormonais e de crescimento, envolvidos na sinalização e crescimento celular, definem basicamente os subtipos moleculares de tumores de mama. O receptor de estrógeno, progesterona e HER2 são classicamente usados para subtipos de câncer de mama (Fulford *et al.*, 2006). Nesse sentido, os tumores da mama podem ser classificados em [ER⁺ | PR⁺] HER2⁺, com resposta à terapia hormonal e melhor prognóstico. Os subtipos [ER⁺ | PR⁺] HER2⁻ e [ER⁻ | PR⁻] HER2⁺, apresentam prognóstico pior em comparação ao subtipo com todos os receptores positivos. Enquanto os subtipos com receptores negativos, conhecido como triplo-negativo [ER⁻ | PR⁻] HER2⁻, são pouco diferenciados, apresentam comportamento agressivo e são menos propensos a responder à terapia hormonal (Dai *et al.*, 2016).

As características histopatológicas dos TNBC's incluem um alto grau nuclear, aumento da atividade mitótica, alta relação citoplasmática nuclear e taxa acelerada de proliferação tumoral (Elsawaf e Sinn, 2011). Além disso, o TNBC representa 15-20% de todos os tipos de câncer de mama, com alta prevalência em mulheres pertencentes a grupos étnicos específicos (*i.e.* afrodescendentes e hispânico-latino-americanas), em idade jovem, com menos de 50 anos e pré-menopausa (Carey *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2017). O TNBC também se caracteriza pelo seu grande tamanho tumoral e aumento de quatro vezes no risco de metástases, com maior frequência para os pulmões e o sistema nervoso central (Sihto *et al.*, 2011; Aysola *et al.*, 2013). Este comportamento metastático agressivo contribui para o pior prognóstico e redução geral da sobrevida de pacientes com TNBC em comparação com os demais subtipos de câncer de mama (Aysola *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2017).

As estratégias para o tratamento de TNBC são desafiadoras. Até o momento nenhuma terapia específica para o TNBC está disponível na prática clínica e a terapia padrão para este tipo molecular de câncer inclui agentes como taxanos, antraciclinas e ciclofosfamida (Yao *et al.*, 2017). Outras estratégias terapêuticas incluem o uso de inibidores da polimerase de ribose poli ADP (inibidores da PARP), inibidores de receptor do fator de crescimento epidérmico

(EGFR), agentes antiangiogênicos (Anders e Carey, 2008; Aysola *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2017), inibidores de receptores tirosina quinase, inibidores mTOR, além do interesse no papel dos compostos de platina, incluindo carboplatina e cisplatina (Yao *et al.*, 2017). Sobretudo, é emergente a necessidade na busca por novas formas de intervenção, sejam adjuvantes, coadjuvantes ou neoadjuvantes, que além de eficazes no combate ao tumor, produzam o mínimo de efeitos colaterais ao paciente. A este respeito, ainda que de forma embrionária, pesquisas acerca dos efeitos do exercício físico na tumorigênese ganham espaço cada vez maior na literatura científica.

Exercício Físico e Câncer de Mama

Após o diagnóstico de câncer é comum que as pacientes alterem sua rotina, consequentemente diminuam suas atividades físicas durante o tratamento e raramente retornam aos níveis de exercícios físicos praticados anteriormente (Vaisberg e Mello, 2010; Wirtz e Baumann, 2018). No entanto, o treinamento físico em mulheres com câncer de mama em estágio inicial, durante ou após o tratamento do câncer, melhora a capacidade aeróbica, força muscular e a função física, reduz a ansiedade e a depressão, sobretudo, dando contribuição à melhoria da qualidade de vida (Speck *et al.*, 2010; Ballard-Barbash *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2012; Loprinzi *et al.*, 2012; Figueira *et al.*, 2018; Wirtz e Baumann, 2018).

Há agora evidências observacionais substanciais de que a prática regular de exercícios físicos de intensidade moderada à vigorosa reduz o risco de desenvolver câncer de mama na pós-menopausa (Friedenreich *et al.*, 2010) e melhora a sobrevida após o diagnóstico de câncer de mama (Loprinzi *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2013). Além disso, a recorrência do câncer também parece depender do estilo de vida pré e pós diagnóstico/tratamento (Wirtz e Baumann, 2018). Embora os estudos sobre atividade física e câncer estejam concentrados em associações epidemiológicas, é importante elucidar os potenciais mecanismos biológicos capazes de sustentar os efeitos anti-tumorigênicos da atividade física, tanto na prevenção do câncer, como na atenuação da taxa de crescimento tumoral (Ruiz-Casado *et al.*, 2017).

Alguns mecanismos para esse efeito protetor da atividade física foram propostos, incluindo alterações nos hormônios sexuais, hormônios metabólicos, capacidade de reparo do DNA e baixo grau de inflamação sistêmica (Campbell e McTiernan, 2007; Ballard-Barbash *et al.*, 2012). As alterações na vascularização e fluxo sanguíneo em tumores, as relações entre o câncer, tecido muscular e o metabolismo, assim como, a disponibilização de substratos e a função imunológica, são sugeridos como possíveis mecanismos pelos quais o exercício físico

pode exercer influência sobre a carcinogênese (Pedersen *et al.*, 2015; Ruiz-Casado *et al.*, 2017).

Deste modo, o entendimento da relação entre a atividade física e tumorigênese pode fornecer evidências e corroborar qualitativamente no âmbito da prescrição de exercícios físicos para pessoas com e sem câncer, e tais investigações podem levar a novas pistas para a biologia do câncer, que podem auxiliar na elaboração de novas modalidades na prevenção e tratamento do câncer (McTiernan, 2008). Neste contexto, apesar do crescente número de publicações, os dados de pesquisa são incompletos e com limitações metodológicas, sobretudo, com recomendações gerais de prescrição de exercícios físicos, sem especificidade e que muito se assemelham as recomendações para indivíduos saudáveis (Wirtz e Baumann, 2018). No geral, ainda não há intervenção específica de treinamento físico para prevenir a incidência, recorrência ou a mortalidade relacionada ao câncer de mama.

Nesse sentido, estudo de meta-análise envolvendo roedores demonstrou que a intensidade do exercício físico parece ser determinante para a modulação da tumorigênese, com benefícios acumulados em sessões com exercícios de intensidade moderada ou vigorosa, e duração de 30 a 45 min, com frequência de cinco vezes por semana (Figueira *et al.*, 2018). Contudo, nesta meta-análise não há distinção entre camundongos e ratos, além de agrupar os mais diferentes métodos para indução tumoral (*i.e.* químicos, transgênicos e inoculação de células tumorais).

Estudos experimentais em modelo animal, utilizando-se de camundongos e exercícios forçados em esteira, com intensidade moderada ou exercício voluntário na roda-livre, têm mostrado efeito benéfico do exercício físico na redução da carcinogênese mamária, com consequente redução do tamanho tumoral (Murphy *et al.*, 2011; Goh *et al.*, 2014; Shalamzari *et al.*, 2014; Aveseh *et al.*, 2015; Betof *et al.*, 2015; Khori *et al.*, 2015). Estes protocolos têm sido desenvolvidos por tempo médio de 45 min, cinco vezes na semana, com duração de 4 a 8 semanas. Além disso, as investigações também têm mostrado que o exercício físico é capaz de causar aumento da densidade e perfusão tecidual com consequente redução da hipoxia intratumoral e aumento de apoptose (Shalamzari *et al.*, 2014; Isanejad *et al.*, 2016), redução nos níveis de citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios (Khori *et al.*, 2015), supressão de receptores de estrogênio (Isanejad *et al.*, 2016) e redução nos níveis de hormônios sexuais (McTiernan, 2008).

De modo geral, os poucos estudos disponíveis na literatura demonstram efeitos positivos do exercício físico, seja como estratégia preventiva ou terapêutica contra o câncer de mama e apontam para o fato do esforço físico ter a capacidade de influenciar o crescimento e

progressão de tumores, com influência sobre mecanismos angiogênicos, hormonais e imunológicos, possivelmente relacionados com alterações no microambiente tumoral.

Microambiente Tumoral

Há mais de quatro décadas as pesquisas tinham como foco principal as células tumorais, entretanto, evidências indicam que os tumores são compostos de parênquima e estroma tumoral (Mao *et al.*, 2013). Na última década, o microambiente tumoral (TME - *tumor microenvironment*) e seu constituinte de células "estromais" tiveram maior destaque, englobando um vasto campo de investigação. O TME é o ambiente celular no qual existe o tumor, incluindo vasos sanguíneos circundantes, células do sistema imunológico, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea, moléculas de sinalização e a matriz extracelular (Pavlides *et al.*, 2009). O tumor e o microambiente circundante estão intimamente relacionados e interagem constantemente (Hanahan e Coussens, 2012). Logo, os tumores podem influenciar o microambiente, liberando sinais extracelulares e promovendo a tumorigênese, enquanto que as células do microambiente tumoral também podem afetar o crescimento e desenvolvimento de células cancerosas.

Uma das evidências diretas de que o microambiente desregulado afeta a tumorigênese é que tecidos sujeitos a inflamação crônica geralmente exibem alta incidência de câncer, além de apresentarem modulações de células do sistema imune (Quail e Joyce, 2013; Turley *et al.*, 2015). Nesse sentido, o principal mecanismo da imunidade a tumores é por meio da resposta de células T, cuja atividade anti-tumoral pode ser resultante da morte direta de células tumorais por linfócitos T citotóxicos CD8⁺. Porém, na maioria dos casos a resposta imune adaptativa contra células tumorais é extremamente fraca e ineficiente (Mantovani *et al.*, 2008). O próprio tumor e o TME regulam negativamente as respostas imunes e escapam da detecção imune inicial, devido ao microambiente imunossupressor que restringe a infiltração e ativação de células T, seja pela ação de citocinas, prostaglandinas, restrição de glicose, ou mesmo pelo recrutamento de populações imunossupressoras encarregadas de manter a tolerância imunológica (Jiang, Y. *et al.*, 2015).

Em adição, a hipoxia é um *hallmark* do microambiente tumoral, como resultado da vascularização defeituosa e redução da perfusão sanguínea, tornando o TME hipóxico e com baixo pH (Justus *et al.*, 2015). A hipóxia e a acidose têm efeitos complexos no metabolismo celular, na evolução das células cancerosas, função oncogênica e supressora de tumores, além de metástases. Além disso, por meio de fatores induzidos por hipóxia (HIF's) os genes glicolíticos, como hexoquinases, lactato desidrogenase (LDH) e transportadores de glicose

(GLUT), são regulados positivamente, fato que gera realce do metabolismo glicolítico nas células tumorais (Wallace, 2012).

A investigação sobre o fenótipo metabólico de células cancerosas tem como marco inicial a pesquisa de Otto Warburg, no início do século XX, quando notou que células tumorais apresentavam exacerbada produção de lactato, mesmo em condições normais de oxigênio, que o levou a denominar tal efeito de “glicólise aeróbica”, também denominado posteriormente de “Efeito Warburg” (Wallace, 2012; Vyas *et al.*, 2016; Zong *et al.*, 2016) (Figura 1). Assim, ao considerar tal fenótipo e TME, a produção excessiva de lactato pela via glicolítica extravasa das células tumorais e contribui para a acidificação do TME, consequentemente, isto favorece a tumorigênese em função de tornar o ambiente hostil para células do sistema imune ao mesmo tempo em que mantém o meio intracelular menos ácido (Justus *et al.*, 2015).

Por outro lado, o TME poderia influenciar e favorecer o crescimento tumoral devido à colaboração de fibroblastos associados ao tumor, fornecendo substratos metabólicos diretamente às células tumorais em um evento denominado “Efeito Warburg Reverso” (Pavlidis *et al.*, 2009; Wallace, 2012; Witkiewicz *et al.*, 2012). Neste modelo, o estresse oxidativo oriundo das células tumorais direciona a secreção de lactato a partir dos fibroblastos associados ao câncer (CAF's), que através de transportadores de monocarboxilatos (MCT's) são transportados para células tumorais. Como consequência, o lactato secretado estimula o metabolismo oxidativo mitocondrial - fosforilação oxidativa (OXPHOS) - nas células cancerosas, e é possível que o mesmo ocorra com cetonas e glutamina, que podem ser utilizados como “combustível” no metabolismo mitocondrial (Pavlidis *et al.*, 2009; Witkiewicz *et al.*, 2012).

Estes mecanismos que envolvem CAF's induzem a carcinogênese mamária e promovem a invasão e metástase no câncer de mama (Mao *et al.*, 2013). A indução de invasão ocorre pelo aumento na atividade de metaloproteinases, angiogênese, extravasamento de células tumorais e múltiplos eventos incluindo a transição epitélio mesenquimal (EMT), até finalmente formar uma nova colônia em microambiente distante (Hanahan e Coussens, 2012; Mao *et al.*, 2013). Portanto, as células cancerosas são capazes de alterar seu metabolismo em favor da tumorigênese. Embora grande parte da reprogramação metabólica seja considerada intrínseca das células cancerosas, há evidências emergentes de moduladores extrínsecos no microambiente tumoral (Mantovani *et al.*, 2008; Pavlidis *et al.*, 2009; Whiteside *et al.*, 2011; Hanahan e Coussens, 2012; Mao *et al.*, 2013).

Figura 1 - Esquema geral de vias metabólicas ativas durante o Efeito Warburg.

O ambiente hipóxico ativa HIF-1 α , responsável por realçar enzimas da via glicolítica (vermelho). Atualmente, CDK-8 também é considerada como indutor de realce da via glicolítica. A redução na função mitocondrial leva a exportação de citrato e malato para o citosol, posteriormente utilizados para vias anabólicas. O MCT-1 importa lactato do meio extracelular para utilização como substrato energético, enquanto MCT-4 exporta lactato para o meio extracelular, aumentando o pH intracelular.

GLUT1: glucose transporter 1; MCT: monocarboxylate transportes, MCT 1/2; HK-II: hexokinase II; LDHA: lactate dehydrogenase A; PDH: pyruvate dehydrogenase; PDK: pyruvate dehydrogenase kinase; GLS: glutaminase; ME: malic enzyme; NADP⁺/NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized / nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; HIF: hypoxia-inducible factors; CDK-8: cyclin-dependent kinase 8; ACC: acetyl-CoA carboxylase, α /beta; NAD⁺/NADH: nicotinamide adenine dinucleotide oxidized / nicotinamide adenine dinucleotide reduced; ETC: electron transport chain.

Nesse sentido, as alterações no metabolismo lipídico têm sido reportadas em muitos tipos de câncer, com influência na proliferação, diferenciação, apoptose, inflamação, autofagia, motilidade e homeostase da membrana (Baumann *et al.*, 2013; Beloribi-Djefaflija *et al.*, 2016). Os lipídios desempenham vários papéis importantes nos níveis celular e orgânico. Os ácidos graxos são os principais blocos de construção para a síntese de triacilglicerídeos (TAG), usados principalmente para armazenamento de energia. Os fosfoglicerídeos, juntamente com os esteróis e esfingolípídeos, representam os principais componentes estruturais das membranas biológicas. Enquanto os lipídios também podem ter papéis importantes na sinalização, funcionando como segundos mensageiros e como hormônios (Santos e Schulze, 2012).

A distribuição lipídica dentro da célula é rigidamente regulada, com os TAG's sendo predominantemente encontrados em gotículas lipídicas intracelulares, enquanto os fosfolipídios são os principais constituintes das membranas (Santos e Schulze, 2012; Beloribi-Djefafli *et al.*, 2016). Os glicolipídios estão localizados no folheto externo das membranas, juntamente com a fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline (SM), enquanto os fosfatidilinosítóis (PI) e fosfatidilserinas (PS) são predominantemente localizados no folheto interno da membrana (Bretscher, 1972; Baumann *et al.*, 2013). Os lipídeos de membrana também dão origem a segundos mensageiros, como diacilglicerol (DAG) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que são formados em resposta a estímulos extracelulares (Rohrig e Schulze, 2016).

Assim, os lipídios servem como sensores que transmitem informações sobre diversos estados celulares para apoiar o desenvolvimento e a homeostase. Disrupções dessas vias de sinalização e mecanismos representam um fator significativo na fisiopatologia do câncer e doenças metabólicas (Baumann *et al.*, 2013; Rohrig e Schulze, 2016).

Alguns cânceres, incluindo mama e próstata mostram aumento da síntese de ácidos graxos, que desempenha papel importante na patogênese do câncer (Santos e Schulze, 2012). Em adição, a importância da síntese de membrana nas células cancerosas tem sido destacada pela observação de que a expressão e atividade da colina quinase, uma enzima necessária para a síntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (os principais fosfolipídios encontrados nas membranas celulares) cujo aumento é relatado em tumores de vários tecidos e se correlaciona com o pior prognóstico (Ramirez De Molina *et al.*, 2002; Baumann *et al.*, 2013). De fato, os tumores de mama, quando comparados com o tecido normal adjacente, foram caracterizados por um notável aumento de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina na membrana (Beloribi-Djefafli *et al.*, 2016), assim como o ácido fosfatídico (PA), considerado um oncometabólico (Sliva *et al.*, 2000; Zhang e Du, 2009; Bruntz *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2018). Portanto, as vias reguladoras do metabolismo lipídico desempenham papel fundamental no desenvolvimento tumoral, e são consideradas importantes alvos de investigação para intervenção clínica.

Adicionalmente, outra via importante de sinalização para o processo de desenvolvimento tumoral e possíveis mecanismos para o surgimento de metástases é a via de sinalização Hippo, a qual desempenha papel crucial na proliferação celular, apoptose, diferenciação e desenvolvimento tumoral (Bae *et al.*, 2017). Quando ativada a via Hippo desempenha papel importante como supressor de tumor em mamíferos, enquanto distúrbios da via e regulação negativa são frequentemente detectados em cânceres humanos e

correlacionados com as propriedades agressivas das células cancerosas (Bao *et al.*, 2011). Os principais responsáveis pela via de sinalização Hippo são as oncoproteínas YAP e TAZ, que atuam como fatores de transcrição juntamente com TEAD (membro da família de domínio TEA) no núcleo. A ativação de LATS1 e LATS2, cuja ação é fosforilar YAP e TAZ, é regulada por múltiplos mecanismos moleculares e fatores podem afetar a atividade da via Hippo, além da fosforilação simples de YAP e TAZ por LATS (Bae *et al.*, 2017). Logo, LATS é responsável por fosforilar e inativar YAP e TAZ e consequentemente exerce papel de supressor tumoral (Bao *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2017) (Figura 2).

Figura 2 - Via de Sinalização Hippo.

A ativação da cascata de sinalização da via Hippo ocorre por meio da fosforilação inibitória de YAP/TAZ, que resulta na sua retenção citoplasmática e degradação proteossomal. Quando a cascata da via Hippo não está ativa, YAP/TAZ é translocado para o núcleo e promove a transcrição de genes alvo. MST: *sterile 20-like kinase* (MST1 e MST2); LATS: *large tumor suppressor* (LATS1 e LATS2); YAP: *Yes-associated protein*; TAZ: *PDZ-binding motif*; TEAD: *TEA domain-containing sequence-specific transcription factors* (TEAD1 a TEAD4). Adaptado de Maugeri-Sacca e De Maria (2016).

Em adição, as investigações acerca do câncer de mama levaram à descoberta de várias vias de sinalização complexas relacionadas a tumorigênese da mama, na qual a via Hippo está implicada na proliferação tumoral e acometimento de metástases relacionadas ao tumor mamário, (Shi *et al.*, 2015; Maugeri-Sacca e De Maria, 2016; Britschgi *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018). A via Hippo também desempenha papel nas metástases pulmonares e foi observado que o aumento na expressão isolada de YAP ou TAZ leva a formação de metástases pulmonares em camundongos (Lamar *et al.*, 2012; Bartucci *et al.*, 2015). Enquanto animais *knockdown* para YAP ou TAZ no câncer de mama, reduzem a incidência de metástases pulmonares (Chen *et al.*, 2014; Bartucci *et al.*, 2015). Além disso, a via Hippo também está relacionada às metástases ósseas do câncer de mama pela ativação de YAP/TAZ em células tumorais (Rashidian *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Várias linhas de evidência

sugerem que a deleção ou mutação de LATS1/2 leva a um fenótipo de câncer de mama mais agressivo, com maior capacidade invasiva (Visser e Yang, 2010; Maugeri-Sacca e De Maria, 2016; Li *et al.*, 2017; Furth *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2018) e evidências têm sugerido que um dos pontos importantes para a ativação da via Hippo são perturbações homeostáticas relacionadas à privação de substratos energéticos (Mao *et al.*, 2015; Ardestani *et al.*, 2018; Furth *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, torna-se importante considerar que o exercício físico, independentemente da condição patológica, perturba vários processos fisiológicos que são regulados por muitos circuitos integrados de controle homeostático (Koelwyn, G. J. *et al.*, 2017). Enquanto a reprogramação do ambiente sistêmico pode impactar em níveis tecidual e celular no microambiente de órgãos distantes, que potencialmente abrigam células transformadas ou um conjunto de células preparadas para a transformação maligna (Koelwyn, Graeme J. *et al.*, 2017). De modo geral, este entendimento global sustenta hipóteses de que o exercício físico crônico pode atuar no microambiente tumoral (Koelwyn, G. J. *et al.*, 2017; Wiggins *et al.*, 2018).

Corroborando, há evidências sobre o impacto do exercício físico sobre o TME em modelo experimental de câncer de mama, o qual demonstrou redução de citocinas pró-inflamatórias (Hojman *et al.*, 2011; Khorrami *et al.*, 2015; Molanouri Shamsi *et al.*, 2017). Admite-se também que os macrófagos estejam envolvidos no efeito supressor do exercício sobre o crescimento tumoral em função do aumento da citotoxicidade avaliada após o treinamento físico (Pedersen *et al.*, 2015). Adicionalmente, em modelo experimental de melanoma, demonstrou-se que o exercício foi capaz de realçar o conteúdo de células NK, com consequente redução do tamanho tumoral (Pedersen *et al.*, 2016). Entretanto, nenhuma alteração no infiltrado de linfócitos foi observada após exercício físico em meio aquático com modelo experimental de câncer de mama (Bianco *et al.*, 2017). Além disso, estima-se que o exercício aeróbico pode melhorar a perfusão e amenizar a hipoxia tumoral via estímulos angiogênicos e redução na expressão de HIF's em modelos xenográficos de câncer de mama (Betof *et al.*, 2015; Khorrami *et al.*, 2015; Isanejad *et al.*, 2016; Wiggins *et al.*, 2018). Contudo, a magnitude acerca do impacto do exercício físico no TME pode ser dependente do tipo tumoral (Glass *et al.*, 2017).

O papel do exercício físico sobre o metabolismo tumoral está alicerçado na capacidade de adaptação que o treinamento exerce sobre a redução circulatória de fatores de crescimento, como insulina e IGF, assim como, restrição a disponibilidade de glicose à células tumorais, competindo diretamente com o tumor por substratos energéticos, fato que influencia

diretamente a ativação de vias metabólicas como PI3K/Akt, reconhecidamente importantes para a tumorigênese (Koelwyn, G. J. *et al.*, 2017). Em modelo xenográfico de tumor de mama, o treinamento físico foi capaz de reduzir os transportadores de monocarboxilato (MCT's) e concentrações de lactato em lisados tumorais, acompanhado da redução da massa tumoral (Aveseh *et al.*, 2015). Da mesma forma, em modelo experimental de tumor hepático, o treinamento de intensidade moderada em meio aquático demonstrou reduzir não apenas o tamanho tumoral, mas também a incidência de metástases, com impacto em moléculas de adesão celular (Zhang *et al.*, 2016). No entanto, ainda há uma lacuna acerca das vias metabólicas e de sinalização pelas quais o exercício físico possa exercer seus efeitos anti-tumorigênicos.

Metabolismo Mitochondrial e Tumorigênese

As mitocôndrias são importantes fábricas bioenergéticas e biossintéticas para a função celular e ao longo do século XX muitos cientistas elucidaram a maquinaria responsável pela respiração mitocondrial, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), cadeia de transporte de elétrons, complexo da ATP-sintase, dentre tantas outras características fundamentais das mitocôndrias para o metabolismo, tanto bioenergético como de homeostase celular (Wallace, 2012; Vyas *et al.*, 2016).

No entanto, desde que Otto Warburg, décadas atrás descobriu que células cancerosas sofrem “glicólise aeróbica”, convertendo glicose em lactato mesmo na presença de oxigênio (Wallace, 2012), as mitocôndrias passaram a representar um importante ramo da pesquisa oncológica. Os achados de Otto Warburg, caracterizados pela inibição da oxidação completa da glicose para alimentar a respiração mitocondrial, chamaram a atenção para o papel das mitocôndrias na tumorigênese e levaram Warburg à hipótese de que tal alteração metabólica ocorreu devido a uma falha respiratória, e este evento metabólico crítico poderia ser considerado então, “a origem da célula cancerosa” (Warburg, 1956; Scatena, 2012; Wallace, 2012). É importante ressaltar que o aumento da atividade glicolítica observada por Warburg, foi semelhante ao observado nas células embrionárias, conduzindo-o a concluir que as células cancerosas, de alguma forma, retornam a um padrão metabólico primitivo (Warburg, 1956).

As hipóteses e/ou justificativas para tais alterações metabólicas mitocondriais foram alicerçadas de modo geral sob a alegação que este fenótipo confere vantagens adaptativas às células cancerosas. Por exemplo, a glicólise sozinha gera ATP mais rapidamente do que a glicólise acoplada a OXPHOS, apesar da baixa eficiência (Smolkova *et al.*, 2010); o aumento da captação de glicose associado a redução na OXPHOS permite uma maior utilização da via

das pentoses fosfato. Isto produz ribose para a síntese de ácidos nucleicos *de novo* e NADPH, a principal fonte de equivalentes redutores para as vias anabólicas (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007; Wallace, 2012); o acúmulo de piruvato e formação de lactato, que resulta em acidificação celular, parecem favorecer células cancerosas à invasão (Wu *et al.*, 2007; Weinberg e Chandel, 2009; Vyas *et al.*, 2016); alguns dos piruvatos acumulados também podem ser redirecionados para a síntese lipídica (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007; Wallace, 2012; Vyas *et al.*, 2016); similarmente, a diminuição da OXPHOS leva ao acúmulo de citrato e à sua exportação da matriz mitocondrial, onde é convertido em acetil-CoA citosólico e pode ser utilizado para síntese de ácidos graxos e colesterol (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007; Vyas *et al.*, 2016).

Além disso, também é importante considerar que alguns cânceres têm mutações em enzimas mitocondriais do TCA. Mutações estas que desencadeiam na inibição da enzima succinato desidrogenase (SDH) e aumentam os níveis de succinato mitocondrial e citosólico, com subsequente inibição de prolin hidroxilases (PHD's) dependentes do α -cetoglutarato, causando assim a estabilização do fator induzível por hipóxia 1α (HIF1 α). O HIF1 α estabilizado é então translocado para o núcleo e provoca mudanças no metabolismo energético com realce da via glicolítica (Wallace, 2012; Vyas *et al.*, 2016). O HIF1 α também pode ser estabilizado quando PHD's são inativadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) que foram geradas a partir da cadeia de transporte de elétrons (Wallace, 2012; Zong *et al.*, 2016). O papel de HIF no realce do metabolismo glicolítico ocorre quando é deslocada a atividade da piruvato-desidrogenase (PDH), haja vista que HIF estimula a fosforilação de PDH por meio da piruvato-desidrogenase quinase (PDK), além de aumentar a expressão de enzimas glicolíticas (Gogvadze *et al.*, 2008). Ainda, a fumarato hidratase (FH) converte fumarato em malato, e células que apresentam mutações em FH produzem até 100 vezes mais fumarato, sete vezes mais succinato, e têm diminuição acentuada nos níveis de malato e citrato (Wallace, 2012). A enzima isocitrato desidrogenase (IDH), responsável por reduzir NADP^+ reversivelmente em NADPH para fornecer energia suficiente em conduzir a carboxilação redutiva de isocitrato à α -cetoglutarato. Mas, quando ocorrem mutações em IDH o NADPH pode ser utilizado para reduzir α -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato (2HG). Como resultado, nas células mutantes a IDH produz níveis aumentados de 10 a 100 vezes 2HG, considerado como "oncometabólico" (Wallace, 2012). Além disso, a maioria dos cânceres demonstram mutações oncogênicas em K-ras, c-Myc e fosfatidilinositol-3 (PI3) quinase ou perda de fosfatase e homólogo de tensinas (PTEN) e p53, que são capazes de inativar complexos respiratórios mitocondriais, mas promovem a glicólise (Heiden *et al.*, 2009).

Nesse sentido, além das mitocôndrias fornecerem energia e precursores para a formação de blocos de construção para novas células, elas também atuam no controle da homeostase redox, sinalização oncogênica e apoptose (Alirol e Martinou, 2006; Gogvadze *et al.*, 2008; Smolkova *et al.*, 2011; Wallace, 2012; Vyas *et al.*, 2016; Zong *et al.*, 2016), demonstrando seu papel fundamental para a homeostase celular. É evidente que as células cancerosas apresentam vários graus de glicólise aumentada, dependendo do tipo da célula e condições de crescimento. Geralmente, na presença de oxigênio, as células cancerosas produzem cerca de 60% do seu ATP através da glicólise (Nakashima *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 2007), enquanto as células normais parecem gerar a maior parte de seu ATP através da fosforilação oxidativa mitocondrial, usando glicose, ácidos graxos e outros intermediários metabólicos como fontes de energia. A este respeito, inicialmente foi determinado que a agressividade do tumor estivesse correlacionada com a baixa atividade da cadeia respiratória mitocondrial, enquanto o aumento da fosforilação oxidativa poderia reduzir o crescimento do tumor (Rossignol *et al.*, 2004; Weinberg e Chandel, 2009; Wallace, 2012).

Entretanto, nem todos os tumores compartilham essa propriedade do “efeito Warburg”, há evidências que defeitos na respiração mitocondrial não são geralmente a causa do “efeito Warburg” (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007). Além disso, a maioria dos cânceres ainda mantém a função mitocondrial, incluindo a respiração. Alguns tumores têm altos níveis de fosforilação oxidativa, enquanto outros que são relativamente glicolíticos, ainda mantêm a respiração mitocondrial e outras funções (Zu e Guppy, 2004; Smolkova *et al.*, 2011). A confirmação de que as células tumorais dependem da mitocôndria funcional reside na evidência de que células cancerosas cujo mtDNA foi eliminado apresentam redução nas taxas de crescimento e diminuição na capacidade de colonização (Moraes *et al.*, 1994; Cavalli *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2015). Nesse sentido, a investigação de Tan e colaboradores (2015) com modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo (células 4T1), demonstrou que células tumorais cujo mtDNA foi eliminado, tem retardo na velocidade de crescimento tumoral. Por sua vez, a formação do tumor demonstrou ser associada à aquisição do mtDNA oriundo das células do hospedeiro, presentes no TME, que por sua vez foram transferidas às células cancerosas o que resultou no restabelecimento da respiração mitocondrial e eficácia da tumorigênese (Tan *et al.*, 2015). Além disso, células desprovidas do mtDNA não foram capazes de gerar nódulos metastáticos no pulmão, ao contrário, células isoladas das metástases pulmonares exibiram reestabelecimento completo da função respiratória mitocondrial (Tan *et al.*, 2015). Estas e outras descobertas sugerem que o papel das mitocôndrias no câncer é ainda mais complexo do que o sugerido por Otto Warburg. Em

contraste, pesquisas apontam para a importância da função mitocondrial no realce da tumorigênese, corroborando com a agressividade tumoral.

Não obstante, faz-se necessário considerar que os diferentes tumores podem apresentar características metabólicas distintas. Há tumores com fenótipo metabólico predominantemente glicolítico, como tumores cerebrais, o glioma C6, meduloblastoma, meningioma, além de cânceres do cólon, como o CT-26 e LoVo adenocarcinoma Novikoff (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007). Enquanto o câncer de pele melanoma, câncer de pulmão e alguns tipos de câncer de mama são predominantemente oxidativos. Há ainda tumores com metabolismo misto, tanto glicolítico como oxidativo, como por exemplo, glioblastoma, Ehrlich, Walker-256 e MCF-7 (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007).

Ademais, essas organelas são altamente dinâmicas, e por meio de processos de fissão e fusão mitocondrial, sofrem mudanças em sua morfologia, comprimento, tamanho e número (Liu *et al.*, 2012). Por conseguinte, a dinâmica mitocondrial é capaz de afetar sua função e vice-versa (Wang *et al.*, 2009). A fissão envolve pelo menos duas proteínas, a DRP1 e outra chamada Fissão 1 (Fis1). A fusão, por sua vez, é regulada por três grandes GTPases, chamadas de Mitofusina 1 (Mfn1), Mitofusina 2 (Mfn2) e proteína atrofia óptica 1 (OPA1) (Wang *et al.*, 2009; Boland *et al.*, 2013; Wai e Langer, 2016; Maycotte *et al.*, 2017). O equilíbrio entre os eventos de fusão e fissão mitocondrial são importantes para a manutenção metabólica celular, além de renovar as organelas danificadas (Maycotte *et al.*, 2017). Quanto ao efeito metabólico, o quadro predominante de fusão mitocondrial é caracterizado por aumento da OXPHOS e produção de ATP mitocondrial, diminuição na síntese protéica e aumento da autofagia (Maycotte *et al.*, 2017). Enquanto a fissão mitocondrial desencadeia defeitos na OXPHOS e redução no consumo de ATP mitocondrial, excesso de nutrientes no ambiente celular, disfunção e proliferação celular, estresse severo e morte de células, além de disfunção mitocondrial e aumento da eliminação por mitofagia (Maycotte *et al.*, 2017).

Portanto, as mitocôndrias e células tumorais possuem alta plasticidade e são capazes de se adaptar aos mais diferentes microambientes. A este respeito, é razoável admitir que durante a tumorigênese as células tumorais passam por transformações metabólicas que favorecem o seu desenvolvimento. Há quase uma década Smolková e colaboradores (2011) e Jose e colaboradores (2011) propuseram a hipótese de que ocorrem estágios ou “ondas” de transformação, capazes de interferir no fenótipo metabólico e reestabelecer a fosforilação oxidativa em células tumorais.

Nesse sentido, pelo menos quatro ondas de transformação ocorrem até que as células tumorais se disseminem, provocando metástases. Neste modelo, um estímulo original, ainda

que desconhecido, leva à desregulação da sinalização de informações e ativa oncogenes e / ou células-tronco cancerosas, dando início à primeira onda de transformação de células tumorais, enquanto a segunda onda de transformação caracteriza-se pela hipóxia, devido a alta taxa de proliferação e angiogênese deficitária, com destaque para a sinalização mediada por HIF's e subsequente realce de enzimas glicolíticas (Alirol e Martinou, 2006; Weinberg e Chandel, 2009; Smolkova *et al.*, 2010; Jose *et al.*, 2011; Smolkova *et al.*, 2011; Wallace, 2012; Zong *et al.*, 2016). Portanto, nas duas primeiras ondas/estágios de transformação celular o metabolismo da glicólise é favorecido em comparação a OXPHOS, ou seja, o fenótipo clássico do “efeito Warburg”. Na sequência, a terceira onda de transformação, tem como principal marcador a restrição à glicose, com o fornecimento de energia provindo via anaplerose, haja vista a escassez de nutrientes devido à alta taxa de proliferação, porém, a função da OXPHOS é parcialmente restaurada devido à reprogramação gênica via LKB1-AMPK-p53 e/ou pela via PI3K-Akt-mTOR, além do aumento na biogênese mitocondrial via PGC-1 α (Smolkova *et al.*, 2010; Jose *et al.*, 2011; Smolkova *et al.*, 2011). A glutaminólise mediada por c-MYC é também envolvida neste processo, corroborando para o TCA truncado a partir das reações com α -cetoglutarato (Smolkova *et al.*, 2011; Wallace, 2012). Na sequência, a quarta onda de transformação tem como característica a revitalização das mitocôndrias, muito provavelmente devido ao reinício da biogênese mitocondrial (Smolkova *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2015) (Figura 3).

Assim, entre as células sobreviventes selecionadas a partir do processo de desenvolvimento neoplásico, será determinado o fenótipo metabólico final da célula tumoral (Smolkova *et al.*, 2011). Em geral, as células cancerosas são altamente adaptáveis a estresses bioenergéticos (Rossignol *et al.*, 2004). Corroborando, a importância das mitocôndrias para o metabolismo das células tumorais, com o reestabelecimento da OXPHOS e agressividade metastática foi demonstrada recentemente em investigação experimental de câncer de mama (Tan *et al.*, 2015).

Figura 3 - Modelo de “Ondas de Transformações” do metabolismo tumoral durante a tumorigênese.

MYC: *myc*-proto-oncogene; mut-p53: *tumor suppressor p53 mutated*; Akt: *protein kinase B*; Ras: *family protein Ras*; GLUT1: *glucose transporter 1*; HK-II: *hexokinase II*; PFKFB: *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase*; LDHA: *lactate dehydrogenase A*; PDK: *pyruvate dehydrogenase kinase*; mut-mtDNA: *mitochondrial DNA mutated*; GLS: *glutaminase*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; PGC-1α: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; AMPK: *AMP-activated protein kinase*; p53: *tumor suppressor p53*; NAD⁺/NADH: *nicotinamide adenine dinucleotide oxidized / nicotinamide adenine dinucleotide reduced*; NO: *nitric oxide*.

Adaptado de Smolkova *et al.* (2011) e Jose *et al.* (2011)

Não obstante, tanto o tipo de câncer, como também os subtipos tumorais dentro de cada câncer, podem apresentar fenótipos metabólicos distintos, o que torna desafiadora a investigação acerca da bioenergética tumoral. Independentemente da mitocôndria estar ou não envolvida no início ou origem do câncer, esta organela apresenta papel crucial para a transformação maligna das células tumorais. Há mais de um século pesquisas acerca do papel da mitocôndria no câncer são desenvolvidas, entretanto, pesquisas acerca do exercício físico sobre o metabolismo e bioenergética tumoral ainda são incipientes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico moderado em modelo experimental de câncer de mama de subtipo triplo-negativo.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o impacto do exercício físico sobre a carcinogênese mamária;
2. Analisar a influência do exercício físico sobre a função mitocondrial do tumor;
3. Analisar o efeito do exercício físico sobre a função mitocondrial de células mononucleares do baço durante o desenvolvimento do câncer de mama;
4. Quantificar a expressão relativa de mRNA's relacionados à bioenergética celular;
5. Averiguar o impacto do exercício físico sobre a expressão relativa de mRNA's da via Hippo;
6. Quantificar o conteúdo de ácidos graxos, fosfolipídios e fosfatidilinositóis fosfato no tumor de mama.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os camundongos da linhagem BALB/c fêmeas de 8 a 10 semanas de idade foram utilizados para o protocolo de exercícios e indução tumoral. Os animais foram obtidos junto ao Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* da Universidade de São Paulo-USP de Ribeirão Preto e mantidos no Biotério do Departamento de Físico-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCF-RP) em ciclo claro/escuro invertido de 12h em temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF-RP, Processo nº. 16.1.791.60.9.

Grupos Experimentais

O desenho experimental foi composto de quatro grupos (10 animais/grupo) que foram treinados com carga de exercício físico estimada como moderada (Fernando *et al.*, 1993). Todos os animais foram inoculados com células tumorais oito semanas após o início do protocolo experimental e quatro semanas após a indução de células tumorais os animais foram eutanasiados. O Grupo [G₁ – SED + SED] não realizou o protocolo de exercícios, enquanto o Grupo [G₄ – ExFis + ExFis] realizou exercício físico durante todo o experimento. O Grupo [G₂ – SED + ExFis] realizou exercício apenas após a indução de células tumorais, inversamente ao Grupo [G₃ – ExFis + SED] que realizou exercícios na esteira somente até a indução de células tumorais (Figura 4).

Figura 4 - Desenho experimental

Protocolo de Exercício Físico

Previamente ao desenvolvimento do protocolo de treinamento os animais passaram por período de adaptação aos exercícios físicos, com duração de uma semana e aumento gradual da carga de treino, (10-15 min) de duração e (8-12 m/min) na velocidade. Em nenhum momento do período de adaptação ou protocolo de exercícios físicos foi utilizado choque elétrico como estímulo à corrida. Quando necessário, leves toques com os dedos no dorso do animal foram empregados.

O protocolo de exercícios físicos foi realizado cinco vezes por semana em esteira motorizada (AVS Projetos Especiais[®]) sem inclinação, com início da sessão entre 3h e 4h após início do ciclo escuro. Em cada sessão teve a duração de 30 min. e foi empregado período de aquecimento com aumento gradual da velocidade, seguido de manutenção da carga com a velocidade média de treino de 18 m/min., totalizando volume médio de 490 m/sessão. Ao final da sessão, a velocidade foi reduzida gradualmente.

Cultura Celular e Inoculação

As linhagens de células de carcinoma mamário murino 4T1 foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640[®] (Sigma-Aldrich, St. Luis, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% penicilina-streptomicina. Para os experimentos *in vivo*, as células foram dissociadas com tripsina e lavadas duas vezes com PBS, e a viabilidade celular determinada utilizando azul de Tripán. Foram utilizadas suspensões celulares com viabilidade igual ou acima de 95%.

Para a inoculação de células tumorais os camundongos foram previamente anestesiados via intramuscular a partir das orientações de Erhardt e colaboradores (Erhardt *et al.*, 1984), com injeção de 50 µL de Xilazina (10 mg/kg) + Ketamina (100 mg/kg). Na sequência, 1×10^4 células/animal (50 µL PBS) foram injetadas subcutâneamente na quarta almofada mamária, lado direito dos animais.

O tamanho dos tumores foi mensurado a partir do 10º dia pós-inoculação das células tumorais utilizando paquímetro. O volume do tumor foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $V = D \times L^2 / 2$ (D= maior diâmetro do tumor (mm); L= menor diâmetro do tumor (mm)) (Jovanovic *et al.*, 2011).

Calorimetria Indireta

A análise do metabolismo corporal dos animais foi realizada por calorimetria indireta, com auxílio do equipamento Oxylet Physiocage[®] (PanLab). O experimento foi

realizado em quatro caixas metabólicas, com 04 animais/caixa. Quando analisado mais de dois grupos, os animais de cada grupo foram divididos em dois subgrupos, para análise posterior, no intuito de realizar as análises concomitantemente em todos os grupos. O período de exposição na caixa metabólica foi de 36-48h, das quais foram utilizadas 24h, correspondentes a um ciclo claro/escuro completo, para análise de parâmetros metabólicos. As variáveis analisadas foram o volume de oxigênio consumido (VO_2); o volume de gás carbônico produzido (VCO_2); coeficiente respiratório (RQ) calculado pela relação $[VCO_2 / VO_2]$.

Sacrifício e Extração Tecidual

O sacrifício dos animais, por meio de deslocamento cervical, foi realizado ao final da décima semana de experimento, 36h após a última sessão de treinamento para os grupos exercitados. Após a extração do tumor uma parte foi retirada para a análise de oximetria e o restante armazenado à -80 °C. O baço foi extraído e processado para isolamento de células mononucleares. O pulmão foi extraído e separado, um pulmão armazenado em tubo plástico e outro em recipiente com meio para inclusão de biópsia Tissue-Tek® (Sigma-Aldrich) para posterior processamento no criostato e análise histológica. Todos os tecidos foram armazenados à -80 °C.

Separação de Células Mononucleares do Baço

Após a extração e lavagem do baço com PBS, o órgão foi homogeneizado em tubo de vidro em 5-10 mL de PBS em temperatura ambiente. A separação das células mononucleares foi realizada com Histopaque® - 1077 (Sigma-Aldrich), conforme orientações do fabricante. O conteúdo foi então transferido para tubo de 15 mL que continha 3 mL de Histopaque® - 1077 (Sigma-Aldrich) para completar volume final de 10 mL. A sequência de procedimentos consistiu em: centrifugar 400g por 30 min. à temperatura ambiente; transferência do anel de células mononucleares para novo tubo 15 mL e realizada duas lavagens com 10 mL de PBS com centrifugação de 250g por 10min em temperatura ambiente. Após lavagens às células foram ressuspensas em 5 mL de PBS e transferidas para oxígrafo. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer com Trypan Blue® (Sigma-Aldrich).

Oximetria Células Mononucleares do Baço

Taxas Respiratórias das Células Mononucleares do Baço

O consumo de oxigênio foi monitorado em oxígrafo Oxygraph-2k[®] (Oroboros, Innsbruck, Áustria). O volume total de 1 mL de suspensão de células mononucleares do baço foram incubadas em 1 mL de PBS suplementado com 10 mM de glicose, mais 1 mL de MiR05 com [EGTA 0,5 mM, MgCl₂ 3 mM, K-lactobionato 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, sacarose 110 mM, albumina 1 g/L, pH 7,1] a 37 °C, 300 rpm. Os estados respiratórios foram determinados da seguinte forma: LEAK, após inibição de ATP sintase por oligomicina (1 µg/mL); NONCOUPLED, na presença do desacoplador mitocondrial carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP, 1 ou 2 µM); e RESIDUAL, após a inibição do complexo III por antimicina A (3 µM AA) (Pesta e Gnaiger, 2012). As taxas residuais foram subtraídas de todos os estados respiratórios. A normalização da oximetria foi realizada pelo número total de células adicionado no oxígrafo.

Oximetria Tumoral

Permeabilização de Biópsias Tumorais

As amostras de biópsia tumoral foram separadas em cubos de 1 mm e colocadas em solução de BIOPS gelada [EGTA 2,7 mM, imidazole 20 mM, taurina 20 mM, potássio 2 mM (2- (N-morfolino) etanossulfônico, 0,5 mM ditiotreitól, 6,5 mM de MgCl₂, 15 mM de fosfocreatina, 0,57 mM de ATP, pH 7,1, conforme recomendado por Oroboros Instruments[®] (Innsbruck, Áustria). Para a permeabilização da membrana plasmática, as biópsias foram colocadas na solução BIOPS contendo saponina (0,01%) durante 10 minutos.

Taxas Respiratórias de Biópsias Tumorais

O consumo de oxigênio foi monitorado em oxígrafo Oxygraph-2k[®] (Oroboros, Innsbruck, Áustria). Aproximadamente 10 mg de biópsia permeabilizada foram incubadas em 2 mL de MiR05 com [EGTA 0,5 mM, MgCl₂ 3 mM, K-lactobionato 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, sacarose 110 mM, albumina 1 g/L, pH 7,1] a 37 °C, 300 rpm. Os estados respiratórios foram determinados da seguinte forma: NADH na presença de substratos exógenos (glutamato 9 mM, malato 5 mM); OXPHOS, após a adição de difosfato de adenosina (ADP 1 mM); LEAK, após inibição de ATP sintase por oligomicina (1 µg/mL); NONCOUPLED, na presença do desacoplador mitocondrial carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP, 1 ou 2 µM); e RESIDUAL, após a inibição do complexo III por antimicina A (3 µM AA) (Pesta e Gnaiger, 2012). As taxas residuais foram subtraídas de todos os

estados respiratórios. Após a determinação das taxas respiratórias, a mistura de reação foi utilizada para quantificação de proteínas usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

Ensaio de Atividade da Citrato Sintase

Aproximadamente 100 mg de amostra foram homogeneizados em 1 mL de tampão RIPA [NaCl 0,75 M, SDS a 0,5%, Tris 0,25 M, Triton X-100 a 5%, EDTA 100 mM suplementado com ortovanadato 100 mM, pirofosfato de sódio e sódio 100 mM, 100 mM de PMSF, 1% de leupeptina], as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Foram incubados 10 mg de proteínas com meio de reação [Tris-HCl 50 mM, ácido 5,5'-di-tiobis- (2-nitrobenzóico 100 µM) (DTNB), Triton X-100 a 0,25%, pH 8,0, suplementado com 50 µM acetil-CoA] a 37 °C durante 10 minutos, a reação foi iniciada com a adição de oxaloacetato (250 µM) (Shepherd e Garland, 1966).

Histologia Pulmonar

Para a análise histológica do pulmão foi utilizado o tecido previamente armazenado em Tissue-Tek® (Sigma-Aldrich) à -20°C. Foram então realizados 9-12 cortes do tecido na espessura de 50µm em criostato, totalizando 3-4 lâminas por animal. Na sequência foi realizada a coloração com a técnica de Hematoxilina-Eosina adaptada de Cardiff e colaboradores (Cardiff *et al.*, 2014), conforme segue: as lâminas congeladas foram mantidas 5 min. em temperatura ambiente e depois umedecidas com água ultrapura; seguida de exposição à hematoxilina por 1min, lavagens com água ultrapura e exposição à eosina por 30 seg. e nova lavagem. A desidratação foi realizada com álcool-100% (2 min.), xilol (9 min). Por fim as lâminas foram unidas à lamínulas com bálssamo e armazenadas para secagem. A análise foi realizada em microscópio óptico motorizado Olympus-BX61VS® e imagens escaneadas com aumento de 20x. Posteriormente as imagens foram processadas no software Fiji® (Schindelin *et al.*, 2012).

Expressão de RNA

Extração de RNA

Para a extração de RNA foram utilizados aproximadamente 70 mg de tecido tumoral homogeneizado em 400 µL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen) utilizando materiais estéreis e livre de RNases. Os procedimentos para extração foram adaptados de Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987). Após a homogeneização foi adicionado 200µL de clorofórmio, o tubo foi agitado e mantido em temperatura ambiente por 3min para então ser

centrifugado à 12.000 g por 15min à 4°C; O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado 500 µL de isopropanol e incubado overnight à -20°C. Após centrifugação 12.000 g por 10min a 4°C o sobrenadante foi desprezado. Então, foi adicionado 500µL de etanol 75% e centrifugado à 7.500 g por 5min a 4°C; O sobrenadante foi desprezado e os tubos incubados em temperatura ambiente para secagem. Por fim, o pellet foi ressuspensão em 50 µL de H₂O RNA-Free.

Conversão de cDNA

Para a conversão de cDNA, a quantificação e grau de pureza das amostras foi analisado por meio de espectrofotometria com o equipamento NanoDrop® 1000 (ThermoFisher). Para estas análises de RNA total foi utilizado 1 µL de amostra e a qualidade da amostra calculada pela razão entre as absorbâncias; A_{260}/A_{280} com valor de ~ 2.0 para identificar a pureza da amostra, livre de DNA, e A_{260}/A_{230} com valores entre 2.0-2.2 para identificar a pureza em relação a ácidos nucleicos e outros contaminantes.

Para as reações de transcriptase reversa (RT-PCR) foram realizadas com os reagentes High-Capacity RNA-to-cDNA® (Applied Biosystems) em tubos 0,5 mL, seguindo orientações do fabricante, 5,8 µL de Mix foram preparados para cada 500 ng de RNA/amostra, em 20 µL de volume final completados com H₂O RNA-Free. Para a reação de transcrição reversa o equipamento Eppendorf Mastercycler EP Gradient S® (Eppendorf) foi configurado conforme descrições no *Data Sheet* dos reagentes High-Capacity RNA-to-cDNA® (Applied Biosystems).

Análise da Expressão Relativa de mRNA (qPCR)

Para a análise de expressão de mRNA foram utilizados os cDNAs provenientes das amostras de interesse e reagentes para as reações de cadeia da polimerase (PCR) GoTaq® qPCR Systems (Promega). Os *primers* dos genes à serem analisados foram primeiramente desenhados para a espécie de interesse com auxílio da ferramenta Primer Designing Tool® - National Center for Biotechnology Information (NCBI). Após a seleção do gene desejado, adotou-se o *PCR product size* mínimo de 150pb e máximo de 200pb, com diferença máxima na *Primer Melting Temperature* não superior à 3. Além disso, o desenho de *primer* foi realizado com junção exon-exon e comprimento de intron entre 100 e 10000pb. A partir das sugestões de *primers* fornecidas pelo *software* foi selecionado aquele com %GC entre 50 e 60. Então, a sequência escolhida foi testada na ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool® (NCBI) para a espécie de interesse no intuito de identificar possíveis sequências homólogas. Constatada a especificidade da sequência selecionada os *primers* foram

adquiridos junto à empresa Exxtend[®], descritos no Quadro 1, com diluição conforme orientações do *data sheet*.

Quadro 1 - Lista de Primer's utilizadas nas reações de PCR

Gene	Forward	Reverse
<i>Fis1</i>	AAAGATGGACTGGTAGGCATG	AGGATTTGGACTTGGAGACAG
<i>Mtp18</i>	TTTGTGGTAGTGTGGCTGAG	TTGTGATTGTCTGCCTCTC
<i>Drp1</i>	CCTCAGATCGTCGTAGTGGGA	GTTCTCTGGGAAGAAGGTCC
<i>Opa1</i>	GAAAATTAGAAAAGCCCTGCCC	GCTCTCAGTAATCTTGTCCAGG
<i>Mfn1</i>	TCTCCAAGCCCAACATCTTC	CGACGGACTTACAACCTTGAG
<i>Mfn2</i>	CATCCCCAGTTGTCTCAAG	CAAGCCGTCTATCATGTCTTG
<i>HKII</i>	GGAGTCTTCGATCCCAGCCG	CTGGTCAACCTTCTGCACTTGG
<i>Hif1a</i>	TGAGTTCTGAACGTCGAAAAGA	TAGACCACCGGCATCCAGA
<i>Glut-1</i>	GTGACGATCTGAGCTACGGG	TCACCTTCTTGCTGCTGGG
<i>Ldha iso1</i>	ATCGTGCACTAGCGGTCTCA	CCATCATCTCGCCCTTGAGT
<i>Ldha iso2</i>	AACCTGGCGCTCTACTTGCT	GGACTTTGAATCTTTTGAGACCTTG
<i>Pdk 1</i>	AAGCAGTTCCTGGACTTCGG	GGCTTTGGATATACCAACTTTGC
<i>VEGFR 1</i>	GTGTCTATAGGTGCCGAGCC	CGGAAGAAGACCGCTTCAGT
<i>VEGFR 2</i>	GCATACCGCCTCTGTGACTT	AAATCGCCAGGCAAACCCAC
<i>Igflr</i>	GCACCAATGCTTCAGTCCCT	TTGGAGCAGTAGTTGTGCCG
<i>Gls</i>	CGTCAGATGGTGTCTAGTCTAGA	ATCAGCAACCTTCCCTCCAGA
<i>IRS-1</i>	CCGATATGGTGATGAGGAGCTG	TGGCAATATTTGATGGGACATCT
<i>Mtor</i>	TCACTTCCTGAACAGCGAGC	GTAGCGGATATCAGGGTCAGG
<i>Me1 iso1</i>	GGACCCGCATCTCAACAAGG	CAGGAGATACCTGTGGAAGTCAG
<i>Me2</i>	GCGTCCGGGGAGAGAAGATG	CGCTCTTGTAAACGTAAACGCC
<i>Mct1</i>	ACGCCGGAGTCTTTGGATTT	TGAGGCGGCCTAAAAGTGG
<i>Mct4</i>	GCACTTAAAGTCGCCCCCG	GAGGGCTGCTTTCACCAAGAAC
<i>Yap</i>	CTGGACCCTCGTTTTGCCAT	TCAACCGCAGTCTCTCCTTC
<i>Taz</i>	CCGGGGATAAAGATGAATCCGT	CCGGAATCGGGCTCCTTAAA
<i>Lats 1</i>	TGATGCGGGTTGGATTATCTC	AGACTTCACCAAACGCTCCT
<i>Lats 2</i>	AGCTGAAGGTGATCAACTGGG	CAGGCTGCTTTCGGATGTCA
<i>Cdk8</i>	GAGACAAAAAGACCCAGCAGC	GGAACGCTGATAGTCGGAGG
<i>Acaca</i>	CTGGTGCAGAGGTACCGAAG	CCTGAGCGTGGGAGAAGATG
<i>Acacb</i>	CCCGCACCTTCTTCTACTGG	CCACAGGTAGGCCTTGACAG
<i>Gapdh</i>	GGAGAGTGTTCCTCGTCCC	TTTGCCGTGAGTGGAGTCAT
<i>β Actina</i>	GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG	AGGGTGTAACACGCAGCTCA

Antes da utilização para análise nas amostras de interesse, a eficiência dos *primers* foi analisada com quatro diluições de cDNA: [1; 0,1; 0,01 e 0,001]. A avaliação considerou a *melting curve*, curvas de amplificação e foram selecionados para utilização *primers* com eficiência entre 90-120%. As reações de qPCR, para eficiência ou quantificação da expressão relativa, foram realizadas no equipamento StepOne[®] Real-Time PCR System e StepOne[®] software v2.3 (Applied Biosystems). Para a análise da expressão relativa, em cada poço: 1 µL de cDNA, 0,4 µL de Primer-Forward, 0,4 µL de Primer-Reverse, 6 µL de qPCR Mix e 4,2 µL de H₂O RNA-Free. A análise de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas com as seguintes condições de ciclagem: *Holding Stage* – 95°C por 10 min; *Cycling Stage* – 40x 95°C

por 15 seg / 60°C por 1 min; *Melt Curve Stage* – 95°C por 15 seg / 60°C por 1 min. Os valores de C_t obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do controle endógeno (GAPDH). Os cálculos foram realizados conforme orientações de Schmittgen e Livak (Schmittgen e Livak, 2008).

Extração de Lipídios

O tecido tumoral congelado foi preparado por homogeneização (Mixer Homogenizer-Labortechnik, Staufen, Alemanha) de aproximadamente 80 mg em 400 µL de água desionizada (H₂O) do sistema de purificação de água integral Milli-Q (Merck-Millipore, Kenilworth, NJ, EUA), então, os lipídios homogeneizados do tecidos foram extraídos para uma monofase de clorofórmio-metanol-água usando o protocolo de Bligh e Dyer (Bligh e Dyer, 1959). Resumidamente, padrões internos foram adicionados (complexo de ácidos graxos de cadeia ímpar em espécies de fosfolipídios - Avanti, EUA). Após o passo monofásico do procedimento de extração, as fases aquosa e orgânica foram separadas por adição subsequente de clorofórmio e água, seguida por centrifugação durante 10 min a 800 x g. A fase orgânica inferior foi removida para um novo tubo de vidro e secada sob azoto e um vácuo parcial (Concentrator Plus, Eppendorf, Alemanha) à temperatura ambiente. Os extratos lipídicos foram dissolvidos em 200 µL de isopropanol: metanol: acetonitrila: água (3: 3: 3: 1, v/v, contendo 2 mM de formato de amônio) para análise por MS/MS^{all}. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) a partir de cada amostra sedimentada.

Análise lipídica por espectrometria de massa Tandem

Os lipídios foram analisados utilizando uma técnica de aquisição de perfil lipídico global livre de viés, denominada MS/MS^{ALL}, empregando fragmentação iônica precursora sequencial. As análises lipidômicas foram realizadas por infusão direta (40 µL de amostra) em isopropanol: metanol: acetonitrila: água (3: 3: 3: 1, v/v, contendo 2 mM de formato de amônio), utilizando auto-amostrador a vazão de 5 µL/min. O fluxo de trabalho do Infusion MS/MS^{ALL} no sistema TripleTOF™ 5600+ (Sciex, CA, EUA) usando a ferramenta de aquisição no Analyst® Software (Sciex, CA, EUA).

O experimento consiste em um escaneamento TOF MS de 200-1500 m/z acumulado por 250 ms seguido por uma aquisição ordenada de espectros de íons de produto adquiridos de 200,051 a 1200,051 m/z com um degrau de 1 Da. Os espectros MS/MS são obtidos a partir de 100 - 1500 m / z acumulados por 100 ms cada e o tempo total de ciclo para o experimento

está em polaridade negativa. Os parâmetros da fonte incluíam gases de nebulização GS1 a 20, GS2 a 15, gás de cortina a 20, tensão de pulverização de íons de modo negativo a -4000, potencial de dispersão a 40 V e a uma temperatura de operação da fonte ESI de 300 ° C. A energia de colisão para cada etapa de MS/MS foi de -40 ± 30 eV. A calibração em massa (<2 ppm) foi realizada periodicamente usando Solução de Calibração Negativa APCI (Sciex-Foster, CA, EUA) injetada via infusão direta a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. A visualização dos dados do MS/MS^{ALL} foi realizada utilizando o software PeakView™ (Sciex-Foster, CA, EUA) e a identificação dos lipídios e quantificação relativa foi realizada utilizando uma biblioteca *in-house* no software LipidView™ (Sciex-Foster, CA, EUA). Os lipídios identificados foram quantificados contra o seu padrão interno correspondente da mesma classe de lipídios ou intimamente relacionados e normalizados para 1 mg de proteína total a partir de amostras de homogenato de tecido tumoral.

Análise Estatística

As análises foram realizadas em cada fase da pesquisa. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni foi utilizada com experimentos com mais de dois grupos experimentais. O teste-*t* independente foi utilizado para análises envolvendo dois grupos. Foram considerados significantes valores estatísticos com $p < 0,05$. Análises estatísticas e gráficos foi realizada com *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Prism, San Diego – USA*).

RESULTADOS

Efeitos do Exercício Físico Aeróbico Moderado em Modelo Experimental de Câncer de Mama Triplo-Negativo

Exercício físico aeróbico moderado reduz a velocidade de crescimento tumoral em modelo experimental de TNBC

O exercício físico aeróbico moderado foi capaz de reduzir a velocidade de crescimento do câncer de mama triplo-negativo em modelo experimental murino com células 4T1. Neste modelo experimental, os animais que permaneceram sedentários durante todo o experimento, previamente e após a inoculação de células tumorais (G_1 – SED+SED) e aqueles que realizaram exercícios físicos apenas no período pré-inoculação tumoral (G_3 – ExFis+SED), apresentaram crescimento tumoral similar. Por outro lado, animais que realizaram exercícios somente após a inoculação de células tumorais (G_2 – SED+ExFis) ou realizaram exercícios previamente e após a inoculação de células tumorais (G_4 – ExFis+ExFis), apresentaram curva de crescimento tumoral similar e concomitantemente diferente em relação aos grupos G_1 (SED+SED) e G_3 (ExFis+SED), sobretudo, à partir da quarta semana de exercícios após a inoculação das células 4T1 (Figura 5).

Figura 5 - Exercício físico aeróbico moderado reduz a velocidade de crescimento tumoral em animais portadores de tumor de mama (4T1).

G_1 – não realizou exercícios físicos pré ou pós-inoculação de células tumorais; $n=9$;

G_2 – realizou exercícios físicos somente após a inoculação de células tumorais; $n=8$;

G_3 – realizou exercícios físicos somente antes da inoculação de células tumorais; $n=8$;

G_4 – realizou exercícios físicos pré e pós-inoculação de células tumorais. $n=9$;

Anova Two-Way – *post hoc* Bonferroni. Média±EPM

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

A análise do tamanho tumoral após a extração evidenciou que o exercício físico aeróbico moderado influenciou o crescimento tumoral, uma vez que animais do grupo G_4 – ExFis+ExFis apresentaram tumores menores em relação aos animais dos demais grupos. Por outro lado, as massas tumorais dos grupos G_2 – SED+ExFis e G_4 – ExFis+ExFis foram similares, as quais diferiram das massas tumorais dos animais dos grupo G_1 – SED+SED e G_3 – ExFis+SED, que também foram similares. É importante considerar que a forma irregular do tecido tumoral torna desafiadora a precisão na averiguação da medida cúbica da massa do tumor. Contudo, a medida da massa tumoral elimina possível viés na medida do tamanho tumoral. Ainda, a massa corporal dos animais dos grupos G_3 – ExFis+SED e G_4 – ExFis+ExFis ao final do experimento foi menor em relação ao grupo G_1 – SED+SED (Figura 6).

Figura 6 - Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre o tamanho e massa tumorais e sobre a massa corporal de animais portadores de tumores de mama (4T1).

(A) Tamanho tumoral após a extração do tumor;

(B) Massa tumoral após a extração do tumor;

(C) Massa corporal dos animais após quatro semanas de indução tumoral.

SED+SED – não realizou exercícios físicos pré ou pós-inoculação de células tumorais; $n=9$;

SED+ExFis – realizou exercícios físicos somente após a inoculação de células tumorais; $n=8$;

ExFis+SED – realizou exercícios físicos somente antes da inoculação de células tumorais; $n=6$;

ExFis+ExFis – realizou exercícios físicos pré e pós-inoculação de células tumorais. $n=9$;

Anova One-Way – *post hoc* Bonferroni. Média±Desvio Padrão

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

A análise da massa tumoral dos animais com câncer de mama triplo-negativo evidenciou que a prática de exercícios físicos aeróbicos somente antes da inoculação de

células tumorais $G_3 - \text{ExFis} + \text{SED}$ não teve efeito algum sobre o crescimento do tumor. Em contrapartida, a realização de exercícios somente após a inoculação de células tumorais $G_2 - \text{SED} + \text{ExFis}$ ocasionou redução de 28 e 16,9 % em relação ao grupo $G_1 - \text{SED} + \text{SED}$ e $G_3 - \text{ExFis} + \text{SED}$, respectivamente. Além disso, a realização de exercícios físicos pré e pós-inoculação de células tumorais $G_4 - \text{ExFis} + \text{ExFis}$ proporcionou redução percentual ainda maior, de 42,8 e 33,4 % em relação ao grupo $G_1 - \text{SED} + \text{SED}$ e $G_3 - \text{ExFis} + \text{SED}$, respectivamente.

Em adição, o treinamento aeróbico moderado também teve impacto sobre a massa do baço e pulmão dos animais portadores de tumores. As massas do baço do grupo $G_2 - \text{SED} + \text{ExFis}$ e $G_4 - \text{ExFis} + \text{ExFis}$ foram significativamente menores em relação ao grupo $G_1 - \text{SED} + \text{SED}$ e $G_3 - \text{ExFis} + \text{SED}$. Da mesma forma, a massa pulmonar de $G_2 - \text{SED} + \text{ExFis}$ e $G_4 - \text{ExFis} + \text{ExFis}$ foi significativamente menor quando comparada ao grupo $G_1 - \text{SED} + \text{SED}$ (Figura 7).

Figura 7 - Exercício físico aeróbico moderado reduz a massa do baço e massa pulmonar de animais portadores de tumores de mama (4T1).

SED+SED – não realizou exercícios físicos pré ou pós-inoculação de células tumorais; $n=9$;
 SED+ExFis – realizou exercícios físicos somente após a inoculação de células tumorais; $n=8$;
 ExFis+SED – realizou exercícios físicos somente antes da inoculação de células tumorais; $n=6$;
 ExFis+ExFis – realizou exercícios físicos pré ou pós-inoculação de células tumorais. $n=9$;
 Anova One-Way – *post hoc* Bonferroni. Média±Desvio Padrão
 * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Portanto, o treinamento aeróbico moderado reduziu a velocidade de crescimento tumoral e teve impacto sobre a massa do baço e pulmão de animais com câncer de mama triplo-negativo. Apesar do exercício físico ter causado efeitos similares sobre a velocidade de crescimento tumoral nos grupos $G_2 - \text{SED} + \text{ExFis}$ e $G_4 - \text{ExFis} + \text{ExFis}$, as diferenças são mais acentuadas quando comparados o grupo $G_1 - \text{SED} + \text{SED}$ ao grupo $G_4 - \text{ExFis} + \text{ExFis}$.

O metabolismo energético corporal é alterado durante a tumorigênese em modelo experimental de TNBC

A avaliação do substrato energético predominantemente oxidado, expresso por meio do quociente respiratório (RQ) a partir da calorimetria indireta durante 24h demonstrou similaridade entre os $RQ_{\text{(pré-tumor)}}$ dos grupos G1 (SED+SED) e G2 (SED+ExFis), os quais se mantiveram sedentários no período prévio à inoculação tumoral. Além disso, estes mesmos quocientes indicam ter havido predominância na utilização de carboidratos como substrato energético. Por outro lado, os grupos G3 (ExFis +SED) e G4 (ExFis +ExFis), exercitados no período anterior à inoculação tumoral, tiveram o $RQ_{\text{(pré-tumor)}}$ similar, indicativo de oxidação mista de substratos energéticos, com utilização tanto de carboidratos como ácidos graxos (Zuntz, 1901) (Tabela 1).

Quatro semanas após a indução tumoral a avaliação do $RQ_{\text{(pós-tumor)}}$ demonstrou que o grupo G1 (SED+SED) apresentou redução do quociente respiratório, enquanto G3 (ExFis +SED) manteve inalterado o RQ após indução tumoral, ambos sugerindo oxidação mista de substratos energéticos. Por outro lado, os grupos G2 (SED+ExFis) e G4 (ExFis +ExFis), exercitados durante a tumorigênese, tiveram oxidação predominantemente de carboidratos neste período (Zuntz, 1901) (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação do quociente respiratório por calorimetria indireta (24h).

	(SED+SED)	(SED+ExFis)	(ExFis+SED)	(ExFis+ExFis)
<i>RQ</i> <i>pré-tumor</i>	$1,00 \pm 0,15$	$1,00 \pm 0,28$	$0,90 \pm 0,12$	$0,90 \pm 0,13$
<i>RQ</i> <i>pós-tumor</i>	$0,94 \pm 0,14^{***}$	$1,00 \pm 0,10$	$0,90 \pm 0,16$	$1,00 \pm 0,13^{***}$

RQ pré-tumor: Quociente respiratório pré-inoculação de células tumorais;

RQ pós-tumor: Quociente respiratório após 4 semanas de inoculação tumoral - $\approx 36h$ pré-sacrifício;

SED+SED – não realizou exercícios físicos pré ou pós-inoculação de células tumorais; $n=9$;

SED+ExFis – realizou exercícios físicos somente após a inoculação de células tumorais; $n=9$;

ExFis+SED – realizou exercícios físicos somente antes da inoculação de células tumorais; $n=9$;

ExFis+ExFis – realizou exercícios físicos pré ou pós-inoculação de células tumorais. $n=9$;

Teste *Student-t* pareado, Média $\pm$ Desvio Padrão.

*** $p < 0,001$

Os resultados demonstram que o exercício físico, executado previamente e após a indução tumoral, foi capaz de alterar o metabolismo energético corporal durante o processo de desenvolvimento tumoral. Contudo, o mesmo não foi observado quando o treinamento foi iniciado ou interrompido após a inoculação de células tumorais.

Considerando que o exercício físico aeróbico moderado ocasionou diferenças proeminentes entre o grupo SED+SED e ExFis+ExFis, tanto antes como após a inoculação de células tumorais, com destaque para a redução na velocidade de crescimento tumoral e alterações no metabolismo energético corporal, estes dois grupos foram escolhidos para as análises da bioenergética tumoral.

Exercício físico aeróbico moderado modula a bioenergética tumoral para fenótipo glicolítico em modelo experimental de TNBC

Para analisar a bioenergética tumoral, a respiração mitocondrial do tecido tumoral foi avaliada. A respiração mitocondrial no tecido tumoral de animais treinados demonstrou ser menor no estado de máxima capacidade de transporte de elétrons (E). Apesar do estado *Leak* (L) apresentar tendência a reduzir-se no grupo treinado, estatisticamente não foi verificada diferença entre os grupos ($p=0,08$) em ambas as condições (Figura 8A). Além disso, o grupo treinado demonstrou menor consumo de oxigênio não mitocondrial ou residual (ROx) (Figura 8C).

Figura 8 - Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre a respiração e controle do fluxo de oxigênio mitocondrial do tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

(A) Velocidade de consumo de oxigênio (O_2) nos estados estimulados com substratos - glutamato, malato, piruvato (S); estado fosforilativo - com adição de ADP (P); estado não-fosforilante - na presença de oligomicina (*Leak*, L); estado desacoplado - na presença de CCCP (E).

(B) Razões de Controle de Fluxo: desacoplamento como fração da fosforilação (L/P); fosforilação como fração da máxima capacidade de transporte de elétrons (P/E); vazamento de elétrons (*leak*) como fração da máxima capacidade de transporte de elétrons (L/E).

(C) Consumo de oxigênio residual (ROx);

(D) Atividade da enzima citrato sintase no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1);

(E) Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre a estimativa do limite bioenergético mitocondrial do tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

Grupo SED $n=9$; Grupo ExFis $n=7$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$

Apesar da avaliação sobre a Razão do Controle de Fluxo não demonstrar diferenças nos controles L/E e L/P, o controle de fosforilação (P/E) foi maior no grupo treinado (Figura 8B). Portanto, a fosforilação das mitocôndrias do tecido tumoral do grupo treinado estão mais próximas ao seu limite máximo respiratório quando comparadas ao grupo sedentário.

Para confirmar se a capacidade mitocondrial do tecido tumoral do grupo treinado seria oriunda também da densidade mitocondrial no ambiente celular, foi mensurada a atividade da enzima citrato sintase, um biomarcador clássico do número de mitocôndrias, que revelou similaridade entre os grupos sedentário e treinado (Figura 8D). Ou seja, mitocôndrias do grupo sedentário tem maior capacidade de resposta a estímulos bioenergéticos quando comparadas ao grupo treinado, independente da densidade mitocondrial (Figura 8E). Em adição, foi realizada a análise sobre a expressão relativa de mRNA de genes envolvidos com a dinâmica mitocondrial, na qual a expressão de genes relacionados à fissão mitocondrial, Fis1 e Mtp18, mostrou-se aumentada no grupo treinado (Figura 9). Na sequência, foi avaliada também a expressão relativa de mRNA de genes relacionados ao metabolismo energético, cujo resultado denota maior expressão de genes envolvidos com o metabolismo anaeróbico e realce na expressão de genes da via glicolítica (Figura 10).

Figura 9 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes relacionados à dinâmica mitocondrial no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

Opa1 – *optic atrophy type 1*; Mfn1 – *mitofusin 1*; Mfn2 – *mitofusin 2*; Drp1 – *Dynamin-Related Protein 1*; Fis1 – *mitochondrial fission 1 protein*; Mtp18 – *mitochondrial fission process 1*; β -actin: housekeeping.

Grupo SED-Mod $n=4$; Grupo ExFis-Mod $n=4$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Figura 10 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes relacionados ao metabolismo energético no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

Ldha(1) – Lactate dehydrogenase A isoform 1; †Ldha (2) – Lactate dehydrogenase A isoform 2; Mct-1 – Monocarboxylate transporter 1; †Mct-4 – Monocarboxylate transporter 4; HKII – Hexokinase II; Pdk – pyruvate dehydrogenase kinase; Glut-1 – Glucose transporter type 1; Glis – Glutaminase; Cdk-8 – Cyclin-dependent kinase 8; Me1 – Malic Enzyme isoform 1; Me2 – Malic Enzyme isoform 2; †Acaca – Acetyl-CoA Carboxylase alpha; Acacb – Acetyl-CoA Carboxylase beta; Gapdh: housekeeping.

Grupo SED-Mod n=6; Grupo ExFis-Mod n=6. †Grupo SED-Mod n=4; Grupo ExFis-Mod n=4.

Teste Student-t independente, Média ± EPM.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

A realização de análise de genes envolvidos na supressão e proliferação de células tumorais demonstrou que a expressão relativa do mRNA do gene p53, importante na supressão tumoral e regulação metabólica, foi maior no grupo treinado. Por outro lado, a expressão de mRNA de Mtor, que tem importante função na proliferação celular, foi menor no grupo treinado. Além disso, o fator de transcrição Hif1a também foi maior no grupo exercitado, enquanto Pten não apresentou diferenças entre os grupos (Figura 11).

Adicionalmente, a expressão relativa de mRNA dos receptores de crescimento IGF1R e IRS1, além de receptores relacionados à angiogênese, VEGFR1 e VEGFR2, foi similar entre os grupos sedentário e treinado (Figura 12).

Figura 11 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes relacionados à tumorigênese.

p53 – tumor protein p53; Mtor – mammalian target of rapamycin; Hif1a – Hypoxia-inducible factors; Pten – phosphatase and tensin homolog; β -actin: housekeeping.

Grupo SED-Mod $n=4$; Grupo ExFis-Mod $n=4$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Figura 12 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes de receptores de crescimento celular e angiogênese no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

IRS1 – Insulin Receptor; IGF1R – Insulin-like Growth Receptor; VEGFR1 – Vascular endothelial growth factor receptor 1; VEGFR2 – Vascular endothelial growth factor receptor 2; β -actin: housekeeping

Grupo SED-Mod $n=4$; Grupo ExFis-Mod $n=4$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Exercício físico aeróbico moderado modulou a respiração mitocondrial de células mononucleares do baço em modelo experimental de TNBC

A respiração mitocondrial de células mononucleares do baço de animais treinados apresentou-se maior nos estados de basal-*Routine* (R), e *Leak* (L) (Figura 13A), assim como o consumo de oxigênio residual (ROx) (Figura 13B). No entanto, não foram observadas alterações na estimativa de desacoplamento mitocondrial (L/E) (Figura 13C). Esses resultados indicam que o treinamento físico induziu maior utilização de ATP sintetizado independente da ATP-sintetase em células mononucleares do baço.

Figura 13 - Efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre a respiração mitocondrial de células mononucleares do baço de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

Consumo de oxigênio no estado de basal-*Routine* (R); estado não-fosforilante-*Leak* (L) na presença de oligomicina; estado desacoplado (E) na presença de CCCP; consumo de oxigênio residual (ROx).

Taxa de desacoplamento mitocondrial: Taxa do controle da perda de elétrons (L/E).

Grupo SED $n=8$; Grupo ExFis $n=7$.

Teste Student-t independente, Média $\pm$ EPM.

* $p<0,05$; *** $p<0,001$

Exercício físico aeróbico moderado aumentou a expressão de mRNA de gene supressor tumoral relacionado a via Hippo e atenuou alterações morfológicas no pulmão em modelo experimental de TNBC

A análise da expressão relativa do mRNA de genes envolvidos na via Hippo, a qual ativada atua na supressão tumoral e redução no acometimento de metástases, demonstrou que Lats2 aumentou significativamente no grupo treinado, enquanto Lats1, Yap e Taz não sofreram modificações (Figura 14).

Figura 14 - Quantificação da expressão relativa de mRNA de genes da via Hippo Signaling no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

Lats - *large tumor suppressor*; Yap *Yes-associated protein*; Taz - *PDZ-binding motif*; β -actin: *housekeeping*
Grupo SED $n=4$; Grupo ExFis $n=4$.

Teste *Student-t* independente. Média $\pm$ EPM.
 $p < 0,05$;

Exercício físico aeróbico moderado reduziu a concentração de fosfolipídios em modelo experimental de TNBC

A análise lipidômica, para avaliar o conteúdo lipídico do tecido tumoral foi realizada. A concentração de ácidos graxos livres (FFA), monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG) não diferiu entre o tecido tumoral de animais sedentários e treinados (Figura 15).

Figura 15 - Concentração de ácidos graxos quantificados no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

FFA – *Free Fatty Acid*; MAG – *Monoacylglycerols*; DAG – *Diacylglycerols*; TAG – *Triacylglycerols*.

Grupo SED $n=6$; Grupo ExFis $n=5$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM

A concentração de fosfolipídios foi similar entre os grupos, exceto para o ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, que apresentaram menor concentração no grupo treinado. Apesar da fosfatidiletanolamina (PE) não apresentar diferença entre os grupos, há tendência

de redução no grupo treinado. Adicionalmente, a cardiolipina, um fosfolipídio quase que exclusivamente mitocondrial, não apresentou diferenças entre o tecido tumoral de animais sedentários e treinados, sugerindo que a densidade mitocondrial em ambos os grupos é similar (Figura 16).

Figura 16 - Concentração de fosfolipídios quantificados no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

PA – *Phosphatidyl Acid*; PC – *Phosphatidylcholine*; PE – *Phosphatidylethanolamine*; PG – *Phosphatidylglycerol*; PI – *Phosphatidylinositol*; PS – *Phosphatidylserine*; SM – *Sphingomyelin*; CL – *Cardiolipin*.
Grupo SED $n=6$; Grupo ExFis $n=5$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM

* $p<0,05$

Ainda, a análise da concentração da quantificação de lipídios não demonstrou diferenças para nenhum subtipo de fosfatidilinositol fosfato (Figura 17).

Figura 17 - Concentração de fosfatidilinositol-fosfato quantificados no tecido tumoral de animais com câncer de mama triplo-negativo (4T1).

PIP – *Phosphatidylinositol phosphate*; MAG – *Monoacylglycerols*; PIP2 – *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; PIP3 – *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*.

Grupo SED $n=6$; Grupo ExFis $n=5$.

Teste *Student-t* independente, Média $\pm$ EPM

Adicionalmente, a análise histológica do tecido pulmonar demonstrou alterações morfológicas mais proeminentes em seções dos pulmões de animais sedentários, sugerindo a instalação de processo metastático neste órgão (Figura 18).

Figura 18 - Exercício físico aeróbico moderado reduz alterações morfológicas no tecido pulmonar de animais portadores de câncer de mama metastático (4T1).

Fotomicrografias representativas de seções do pulmão processadas com H&E e visualizadas em aumento de 20x.

DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizamos modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo com células 4T1 para avaliarmos o efeito do exercício físico aeróbico na tumorigênese mamária. Nossos resultados demonstraram que o exercício físico aeróbico moderado foi capaz de reduzir a velocidade de crescimento tumoral. A redução no tamanho tumoral no grupo de animais treinados foi associada a modulações no metabolismo energético do tumor, caracterizada por menor capacidade respiratória mitocondrial e aumento na expressão de mRNA vinculados ao metabolismo glicolítico. Interessantemente, animais exercitados apresentaram também menor conteúdo de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina. Adicionalmente foi observado aumento na expressão de mRNA de supressores tumorais, como *Lats2*, responsável por ativação da via Hippo, assim como, aumento na expressão de *p53*, com reconhecido papel na supressão de células cancerosas.

Impacto do Exercício Físico Aeróbico sobre o Volume e Massa Tumoral

Evidências epidemiológicas demonstram a importância da prática regular de exercícios físicos na redução do risco de desenvolvimento de câncer (Brown *et al.*, 2012; Clague e Bernstein, 2012). Especificamente em relação ao câncer de mama, a prática regular de exercícios físicos é relacionada tanto à redução no risco de desenvolvimento, como também na recorrência de câncer de mama (Ferrer *et al.*, 2011; Dethlefsen, Pedersen, *et al.*, 2017). Além disso, benefícios pós-tratamento, sobretudo, com ação positiva no bem-estar emocional, combate à ansiedade, fadiga (Schmitz *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2014) e cardiotoxicidade provocada pela ação de agentes quimioterapêuticos (Scott *et al.*, 2011; Furmaniak *et al.*, 2016), também tem recebido atenção de pesquisadores. No entanto, o conhecimento acerca da utilização do exercício físico como ferramenta para a intervenção no processo tumoral, ainda é incipiente, sobretudo quando se considera as vias metabólicas suscetíveis à ação do exercício físico.

Nosso estudo, de caráter experimental com câncer de mama do tipo triplo-negativo, demonstrou que animais submetidos ao treinamento aeróbico moderado previamente e após a inoculação de células tumorais ou apenas após a inoculação, quando comparados ao grupo sedentário, tiveram redução de 54,5% e 34,7% no tamanho tumoral, respectivamente. Os resultados obtidos também evidenciaram que a interrupção do treinamento após a inoculação de células tumorais favoreceu a tumorigênese de modo similar ao grupo sedentário. O volume tumoral é um dos parâmetros utilizados para classificação e prognóstico do paciente, com o pior prognóstico proporcional ao tamanho do tumor (Elkin *et al.*, 2005; Narod, 2012). Adicionalmente, a tendência de pessoas alterarem seu estilo de vida após diagnóstico de

câncer, sobretudo, afastando-se da prática de exercícios físicos (Wirtz e Baumann, 2018), requer atenção sobre o impacto do exercício físico na vida cotidiana de pacientes com câncer de mama.

Corroborando, investigações experimentais com inoculação de células de câncer de mama com receptor de estrógeno positivo (células MC4L2) em animais submetidos a programas de treinamento aeróbico, demonstraram o importante impacto do exercício físico na redução do tamanho tumoral (Khorri *et al.*, 2015; Isanejad *et al.*, 2016). Adicionalmente, outros modelos tumorais com treinamento aeróbico também têm demonstrado efeitos positivos do exercício físico, o qual reduziu o volume tumoral em animais com melanoma (Pedersen *et al.*, 2016), câncer hepático (Zhang *et al.*, 2016), câncer de intestino e cólon (Zielinski *et al.*, 2012). Por outro lado, com modelo xenográfico de TNBC, animais inoculados com 5×10^6 células MDA-MB-231 e treinados em esteira, cinco dias por semana à 18 m/min por 45 min ao longo de 8 semanas não apresentou diferença entre o grupo sedentário e treinado (Jones *et al.*, 2005). Em adição, também não foi verificada diferença entre o grupo sedentário e treinado de animais inoculados com 1×10^6 células MDA-MB-231 após 6 semanas de atividade física em *Wheel Running* (Jones *et al.*, 2010).

Entretanto, investigações sobre os efeitos do exercício físico no câncer de mama, especificamente no subtipo triplo-negativo ainda são escassas e heterogêneas em modelo experimental. Por exemplo, em protocolos de exercícios forçados, animais submetidos a treinamento intervalado em esteira a partir da velocidade máxima mensurada em teste prévio, com sessões de 50 min (10 min aquecimento – 10 x 2 min 70% V_{max} – separados por 2 min à 50% da V_{max}), seis semanas pré e seis semanas após a inoculação de 1×10^6 células tumorais do tipo 4T1 não foi capaz de reduzir o tamanho tumoral (Molanouri Shamsi *et al.*, 2017). Por outro lado, o exercício em meio aquático, durante quatro semanas (*i.e.* 15 min. semana-1, 30 min. semana-2 e 45 min. semanas-3 e 4), cinco dias por semana durante quatro semanas, teve impacto positivo na redução do volume tumoral em animais inoculados com cinco vezes menos células (*i.e.* 2×10^5 células 4T1) (Bianco *et al.*, 2017). É importante destacar que em nosso estudo, com exercícios forçados em esteira, tanto o protocolo de treinamento, como a inoculação de células tumorais (*i.e.* igual à 1×10^4 células 4T1), foi diferente de ambos os estudos. Portanto, a periodização de treinamento e quantidade de células injetadas podem levar a diferentes respostas à respeito dos efeitos do exercício físico no TNBC.

Embora exercícios voluntários tenham apresentado resultados positivos na redução da tumorigênese, há também heterogeneidade nos protocolos. Nesse sentido, o modelo experimental de atividade física voluntária em *Wheel Running* por nove semanas antes e

apenas dezoito dias após a inoculação de 5×10^4 células 4T1, reduziu a velocidade de crescimento tumoral (Betof *et al.*, 2015). Em outro estudo com inoculação de volume ainda menor de células (*i.e.* 1×10^4 células 4T1) e que também avaliou aspectos de envelhecimento, animais com 18 meses de idade e acesso a *Wheel Running* 60 dias antes e 30 dias após a inoculação de células tumorais, demonstrou redução no volume tumoral proporcional a distância percorrida (Goh *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a análise com três modelos experimentais classificados como TNBC do subtipo *claudin-low*, no qual os animais foram submetidos ao exercício aeróbico em esteira, exibiu diferentes sensibilidades ao treinamento (Glass *et al.*, 2017). Neste estudo, os animais foram submetidos ao exercício aeróbico à 20 m/min, com 5% de inclinação por 45 min., cinco vezes por semana durante 15 dias. Os resultados demonstraram que animais inoculados com células EO771 (1×10^5 células) tiveram redução do volume tumoral, enquanto em animais inoculados com células 4TO7 (5×10^4 células), nenhuma diferença entre o grupo treinado e exercitado foi observada. Apesar do volume de células inoculadas serem 50% menor quando comparado ao grupo inoculado com EO771 células. Surpreendentemente, o grupo de animais transgênicos C3(1) SV40 Tag p16-luc, que desenvolvem espontaneamente o TNBC, apresentaram crescimento tumoral superior no grupo treinado (Glass *et al.*, 2017). Contrariamente, o estudo de Murphy e colaboradores (2011), também com transgênicos C3(1) SV40 Tag submetidos a protocolo de exercício em esteira seis vezes por semana, a 20m/min com 5% de inclinação, mas durante 60 minutos e ao longo de vinte semanas, demonstrou redução significativa no volume tumoral. Sugerindo que os efeitos anti-tumorigênicos do exercício físico podem apresentar variações de acordo com as características de cada tumor.

Há mais de duas décadas, a pesquisa em modelo experimental de carcinogênese mamária induzida quimicamente, demonstrou que a intensidade e duração do exercício físico afetam o desenvolvimento do câncer de mama (Thompson, 1994; Figueira *et al.*, 2018). Contudo, apesar da intensidade parecer um fator determinante na modulação dos desfechos tumorais no câncer de mama e também outros tipos de tumor, em geral, os resultados dos estudos não apresentam resultados significativos sobre a quantidade ideal de exercício (*i.e.* intensidade, duração e frequência) para obter benefícios (Figueira *et al.*, 2018).

Apesar da heterogeneidade de pesquisas experimentais acerca do TNBC com exercícios físicos forçados ou voluntários, a identificação de redução na velocidade do crescimento tumoral por meio exclusivamente do exercício físico, o coloca como importante ferramenta a ser explorada no tratamento do câncer de mama. Haja vista que o mesmo programa de treinamento pode induzir diferentes respostas de acordo com o subtipo tumoral,

é razoável admitir que diferentes modelos tumorais possam ter sensibilidade diferente em relação à resposta ao treinamento. Assim, há a necessidade de padronizações sobre a periodização de treinamentos voltados aos efeitos anti-tumorigênicos do exercício físico. Além disso, em modelos experimentais a quantidade de células inoculadas no animal também pode ser um fator determinante para a resposta anti-tumorigênica do exercício físico. Portanto, há a necessidade de adequação da carga de exercícios em consonância com o modelo/subtipo tumoral e características do indivíduo portador de câncer.

Exercício Físico Aeróbico Moderado e Metabolismo Mitocondrial no TNBC

A bioenergética do câncer ficou esquecida por muito tempo na biologia do câncer, apesar de Otto Warburg, ainda na década de 1920, ter relatado um padrão metabólico característico de tumores (Warburg *et al.*, 1927; Warburg, 1956; Ferreira *et al.*, 2012). Não obstante, o interesse pelo entendimento acerca do metabolismo tumoral e o papel da mitocôndria na tumorigênese tem recebido cada vez mais atenção em pesquisas sobre o câncer (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007; Pavlides *et al.*, 2009; Weinberg e Chandel, 2009; Wallace, 2012; Boland *et al.*, 2013; Pavlova e Thompson, 2016; Wai e Langer, 2016; Aung *et al.*, 2017).

Nossos resultados acerca da bioenergética tumoral demonstraram que, a atividade mitocondrial de células tumorais de animais sedentários, é maior em comparação às células tumorais de animais exercitados, com aumento significativo na capacidade da cadeia de transporte de elétrons (E), demonstrando maior capacidade respiratória independentemente do conteúdo mitocondrial. Além disso, o tecido tumoral de animais sedentários teve maior consumo de oxigênio residual (ROx), indicando aumento na atividade de enzimas celulares que consomem oxigênio e reações de auto-oxidação, incluindo atividades de peroxidases e oxidases (Pesta e Gnaiger, 2012). A este respeito, a NADPH oxidases presentes no TME favorece o desenvolvimento tumoral (Meitzler *et al.*, 2014). A superexpressão de NADPH oxidases no câncer de mama resultou em senescência celular, resistência a apoptose e aumento na tumorigenicidade (Graham *et al.*, 2010). Corroborando, peroxidases presentes no TME também são capazes de promover a progressão do câncer de mama em modelo experimental de animais inoculados com células 4T1 (Panagopoulos *et al.*, 2017). Por outro lado, a fosforilação como fração da máxima capacidade de transporte de elétrons (P/E) foi maior no grupo de animais treinados, indicando que a fosforilação nestas mitocôndrias estão mais próximas da capacidade máxima da cadeia de transporte de elétrons. Ademais, a análise da expressão de mRNA de genes ligados à dinâmica mitocondrial sugere que mitocôndrias do

tecido tumoral de animais treinados podem estar em processo de fissão mitocondrial. Apesar dos eventos de fissão estar relacionados aos efeitos de desenvolvimento pró-tumorais (Zong *et al.*, 2016; Maycotte *et al.*, 2017), os fragmentos mitocondriais aumentados são mostrados também durante a privação de nutrientes, estresse metabólico severo como hipoxia e sinais apoptóticos (Senft e Ronai, 2016). Em adição, o processo de fissão mitocondrial leva à redução na capacidade de fosforilação oxidativa (Maycotte *et al.*, 2017).

A função da mitocôndria no metabolismo tumoral permanece controversa na pesquisa oncológica (Weinberg e Chandel, 2009). Apesar do aumento da glicólise ser um *hallmark* da tumorigênese, as investigações sobre o metabolismo tumoral que destacam a importância da OXPHOS no microambiente e bioenergética tumoral tem adquirido cada vez mais espaço na literatura (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007; Weinberg e Chandel, 2009; Zheng, 2012; Jia *et al.*, 2018). Enquanto a inibição da glicólise pode restaurar altas taxas de OXPHOS em células neoplásicas (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007). Corroborando com nossos dados, o modelo experimental de TNBC com células 4T1, demonstrou que a respiração mitocondrial é fundamental para o crescimento e progressão tumoral (Tan *et al.*, 2015). Resultado similar também foi encontrado em modelo experimental singênico com melanoma a partir de células B16 (Vazquez *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a investigação com adenocarcinoma ductal pancreático demonstrou que subpopulações de células tumorais dormentes são responsáveis pela recidiva do tumor e têm características de células-tronco cancerosas dependente da fosforilação oxidativa para a sobrevivência (Viale *et al.*, 2014). Além disso, as células sobreviventes apresentam alta sensibilidade aos inibidores da fosforilação oxidativa, que podem inibir a recorrência do tumor (Viale *et al.*, 2014). Em estudo *in vitro* com células MCF-7 a fosforilação oxidativa também demonstrou importância para o metabolismo energético, com aproximadamente 80% do ATP produzido via mitocondrial (Guppy *et al.*, 2002). Enquanto o modelo xenográfico de glioblastoma, animais portadores do tumor apresentaram tanto a utilização da via glicolítica durante a agressividade do tumor, como também a oxidação da glicose via piruvato desidrogenase e ciclo do ácido cítrico (Marin-Valencia *et al.*, 2012).

Ainda, nossos resultados sobre a análise da respiração mitocondrial em células mononucleares do baço (CMB) dos grupos sedentário e treinado foi inversa ao encontrado no tecido tumoral. Em animais treinados as CMB tiveram maior capacidade de respiração no estado Routine (R). Nessas células foi detectado também aumento no estado Leak (L), sugerindo maior produção de ATP por vias independentes da ATP-sintetase, por via glicolítica. Em adição, não houve diferença na razão de desacoplamento mitocondrial (L/E),

indicando que não houve alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Ainda, essas células demonstraram maior consumo de oxigênio não relacionado à atividade mitocondrial (residual, ROx), fato que sugere o consumo de oxigênio por enzimas celulares (Pesta e Gnaiger, 2012). Por exemplo, em linfócitos a NADPH oxidase é importante fonte para geração de espécies reativas de oxigênio e considerada um regulador crítico da função de células T (Purushothaman e Sarin, 2009).

A maior atividade em vias extra-mitocondriais para a geração de energia em CMB pode ser indicativa de maior capacidade efetora destas células, com destaque para os linfócitos, que permanecem normalmente em estado quiescente e utilizam principalmente ATP oriundo da via glicolítica para atender suas demandas energéticas quando ativados (Kramer *et al.*, 2014; Blagih *et al.*, 2015; Buck *et al.*, 2016). Contudo, é importante destacar que a análise de respiração mitocondrial realizada não permite especificar se há diferença entre os subtipos de CMB (*i.e.* linfócitos, macrófagos e células dendríticas) (Perper *et al.*, 1968) em relação à bioenergética mitocondrial. Em adição, se tais alterações precoces no fenótipo metabólico em monócitos e linfócitos presentes no baço podem ser detectadas nos monócitos e linfócitos pré-diferenciados na circulação ou presentes no TME, não está claro (Kramer *et al.*, 2014). Além disso, a utilização da medida da massa do baço como índice indireto de inflamação sistêmica (Molanouri Shamsi *et al.*, 2017), sugere a partir dos nossos resultados que o exercício físico foi capaz de modular a resposta imune, haja vista a redução, de forma dependente do volume/intensidade do exercício, na massa do baço de animais que se exercitaram previamente e após indução tumoral ou apenas após a inoculação tumoral. Entretanto, apesar das diferenças significativas, todos os animais apresentaram esplenomegalia.

Portanto, análises recentes exploram as mudanças no metabolismo mitocondrial e importância da fosforilação oxidativa durante o desenvolvimento tumoral (Jose *et al.*, 2011). Nossa pesquisa é pioneira sobre o impacto do exercício físico no metabolismo mitocondrial de TNBC, cujos resultados sugerem que o maior tamanho tumoral no grupo sedentário está associado a maior capacidade de respiração mitocondrial do tecido tumoral, contrariamente ao grupo treinado, que apresenta mitocôndrias no limite de sua capacidade de fosforilação. Em adição, torna-se fundamental o entendimento não apenas das características bioenergéticas de cada célula tumoral, como também os processos de transformação metabólica durante o processo neoplásico, tendo em vista o melhor entendimento na progressão da doença e desenvolvimento de formas mais eficazes de intervenção.

Transformação Tumoral do TNBC e Exercício Físico Aeróbico Moderado

É fundamental considerar que células tumorais passam por reprogramação metabólica, capaz de fornecer suporte à proliferação, além de apresentarem a capacidade de interagir com células normais, fato que torna complexa a compreensão bioenergética do microambiente tumoral (Ferreira *et al.*, 2012). Os tumores são compostos de populações de células heterogêneas que têm diferentes habilidades para responder a estímulos externos. De fato podem ocorrer fenótipos distintos em células cancerosas localizadas dentro do mesmo tumor maligno (Smolkova *et al.*, 2011; Moreno-Sanchez *et al.*, 2016).

Interessantemente, nossos dados apontam para diferenças importantes acerca da análise sobre a expressão de mRNA relacionados ao metabolismo energético, com aumento na expressão de genes-chave envolvidos na glicólise (*i.e.* Hif1a, Cdk-8, HKII, Pdk, Ldha, Glut-1 e Mct-1) sugerindo realce na via glicolítica no grupo treinado em comparação ao grupo sedentário. Estes dados corroboram com o resultado encontrado na análise de calorimetria indireta ao final do desenho experimental, no qual o grupo treinado apresentou predomínio na utilização de carboidratos como fonte energética, enquanto o grupo sedentário indica utilização mista de carboidratos e ácidos graxos como substratos energéticos. Em adição, o controle de fosforilação oxidativa no grupo treinado indica estar no limite de sua capacidade, fato que permite a possibilidade de utilização de vias metabólicas adicionais para o suprimento energético. Ainda, nosso trabalho é o primeiro a avaliar parâmetros do metabolismo energético em modelo experimental de TNBC com células 4T1, embora trabalhos que envolvam exercício físico e metabolismo energético em modelo experimental de câncer de mama em geral sejam escassos na literatura.

Dentre os raros trabalhos, Glass e colegas (2017) identificaram em modelo de TNBC com células EO771 a redução na expressão de Hif1a mediante o treinamento e nenhuma diferença na expressão de Glut-1 entre os grupos sedentário e treinado. Enquanto animais transgênicos para desenvolvimento de TNBC demonstraram aumento do tamanho tumoral com treinamento, assim como elevada expressão de Hif1a, Pdk e redução de Glut-1 (Glass *et al.*, 2017). Corroborando, Jones e colaboradores (2010) apesar de não relatarem diferenças no tamanho tumoral em modelo experimental xenográfico com células MDA-MB-231, verificaram aumento na expressão de HIF-1 α seguido de aumento na vascularização tumoral no grupo treinado. Da mesma forma, porém em modelo com células MC4-L2, Aveseh e colegas (2015) relataram redução na expressão de LDH-A e MCT-1 e aumento em LDH-B. Ambas as pesquisas sugerem o aumento da vascularização do tecido tumoral com

consequente redução da hipoxia. Porém, de modo contrário, mas também em modelo experimental com células MC4-L2, Isanejad e colaboradores (2016) identificaram diminuição na expressão de HIF-1 α e VEGF o qual foi associada à redução na angiogênese com consequente diminuição do tamanho tumoral. Vale destacar que apesar dos estudos de Aveseh e colegas (2015) e Isanejad e colaboradores (2016) utilizarem quantidade similar de células inoculadas o protocolo de exercícios foi distinto, realizado por sete dias/semana ao longo de sete semanas com velocidade progressiva até 20 m/min durante 55 min, e por 5 dias/semana ao longo de 5 semanas com velocidade de 16-18 m/min por 14min, respectivamente. Portanto, a heterogeneidade dos modelos experimentais, assim como dos resultados, dificulta a análise aprofundada acerca do impacto do exercício físico no metabolismo energético tumoral.

Não obstante, deve-se considerar que tumores contêm regiões oxigenadas e hipóxicas, portanto a população de células tumorais é heterogênea e a interação entre células tumorais glicolíticas e oxidativas regulam mutuamente seu acesso a metabólitos energéticos (Sonveaux *et al.*, 2008; Pavlides *et al.*, 2009). A respeito das alterações fenotípicas que ocorrem em células tumorais, Jose e colaboradores (Jose *et al.*, 2011) e Smolkova e colaboradores (2011) propuseram que tumores sofrem quatro estágios de reprogramação na expressão de genes que alteram o fenótipo metabólico durante a tumorigênese: i) ativação oncogenes; ii) realce glicólise; iii) anaplerose e; iv) reativação da OXPHOS. Nesse sentido, de modo sucinto, o primeiro estágio é caracterizado pela ativação de oncogenes e alteração metabólica caracterizada pelo “Efeito Warburg” (Smolkova *et al.*, 2011). Este fenótipo permite a alta taxa de proliferação e crescimento tumoral, porém, com angiogênese prejudicada e consequente hipóxia (Smolkova *et al.*, 2011; Wallace, 2012). Sequencialmente, o segundo estágio fica caracterizado pela hipóxia e reprogramação metabólica com fortalecimento do fenótipo glicolítico (Jose *et al.*, 2011; Smolkova *et al.*, 2011; Zheng, 2012).

Portanto, haja vista que os animais do grupo treinado em nosso experimento apresentaram realce no metabolismo glicolítico e menor capacidade respiratória comparada ao grupo sedentário, é razoável admitir que o momento metabólico ou estágio de desenvolvimento tumoral em animais submetidos ao exercício físico moderado é caracterizado por fenótipo energético similar ao “Efeito Warburg”, conforme proposto por Jose e colaboradores (2011) e Smolkova e colaboradores (2011) acerca das “ondas” de transformações tumorais. Sobretudo, em função do aumento na expressão de HIF-1 α e CDK-8, reconhecidamente ativados em condições de hipoxia (Galbraith *et al.*, 2017) e que está em consonância com a análise de oxigênio residual (ROx) menor no grupo treinado. Sob estas condições, o fator de transcrição HIF-1 α e CDK-8 são responsáveis por transformações

metabólicas em prol do realce na via glicolítica, estimulando a expressão de genes como HK-II, PDK, LDH e GLUT's, assim como, fatores angiogênicos e inibição da função mitocondrial (Wallace, 2012).

Não obstante, a condição de realce no metabolismo glicolítico permite que os tumores suportem a alta taxa de proliferação, entretanto, o metabolismo glicolítico elevado não pode ser mantido por tempo prolongado em função do aporte de substratos, inevitavelmente resultando em aglicemia (Smolkova *et al.*, 2010; Jose *et al.*, 2011; Smolkova *et al.*, 2011). Nesse sentido, é evidente que o grupo treinado apresenta menor velocidade de crescimento tumoral mediada pelo exercício físico, possivelmente por redução na velocidade de transformação do metabolismo tumoral. Conforme Jose e colaboradores (2011) e Smolkova e colaboradores (2011) a progressão tumorigênica para o terceiro estágio de transformação tumoral é caracterizado por aglicemia e glutaminólise, na qual a via anaplerose é responsável por reestabelecer a OXPHOS, suprimindo os estágios anteriores (Smolkova *et al.*, 2011). Vale ressaltar que a glutaminase, capaz de gerar glutamato a partir da glutamina e disponibilizá-lo para o TCA (Wallace, 2012), pode ser utilizada como um biomarcador do terceiro estágio de transformação tumoral, com aumento de energia provinda da via anaplerótica (Smolkova *et al.*, 2011). Contudo, em nosso estudo não foi verificada diferença na expressão de mRNA para a glutaminase entre os grupos treinado e sedentário, reforçando a hipótese de que o retardo no crescimento e proliferação tumoral decorrente do programa de exercícios físicos é mediado via metabolismo energético.

Corroborando, nossos resultados acerca do controle na proliferação celular, apesar de não demonstrar diferenças em relação à expressão relativa de mRNA de Pten, responsável por inibir a via de crescimento celular mediado por PI3K/Akt/Mtor (Wallace, 2012), observamos redução significativa na expressão de Mtor. Contudo, é importante considerar que o valores absolutos ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para a expressão de Mtor no grupo treinado e controle foi pequena. Outros genes relacionados ao crescimento e proliferação tumoral, como IGF1R, IRS1 e receptores de VEGF (VEGF R1/R2), com consequente realce na angiogênese, também não apresentaram diferenças entre os grupos sedentário e treinado. No entanto, verificamos aumento significativo na expressão relativa de p53 no grupo treinado, cujo papel principal está na capacidade de supressão tumoral devido a sua capacidade em regular o ciclo celular e genes apoptóticos (Wallace, 2012; Vyas *et al.*, 2016). Além disso, p53 também está envolvida com o metabolismo energético celular e o equilíbrio entre glicólise e OXPHOS (Matoba *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007). Em condições normais, p53 inibe a glicólise e promove a OXPHOS (Wang *et al.*, 2012). Todavia, Jiang e colaboradores (2015) identificaram que p53 pode ter

participação na tumorigênese permitindo a adaptação ao estresse metabólico, cujo estímulo pró-sobrevivência foi relacionado ao realce na oxidação de ácidos graxos e respiração mitocondrial, corroborando com a adaptação de células tumorais em condição de privação energética.

Embora nossos resultados demonstrem que a expressão relativa de mRNA no grupo treinado foi menor para Mtor e maior para p53, contrapondo a elevação em Hif1 α e seu estímulo à glicólise, é fundamental considerar que a análise de mRNA permite apenas a análise de expressão gênica, haja vista que modificações pós-transcricionais e a função proteica podem ainda diferir e não representar grau de eficiência ou deficiência com base apenas na expressão relativa de mRNA. Ademais, em nossa pesquisa é fato que o exercício físico foi capaz de modular a tumorigênese, cuja redução culminou em tamanho tumoral significativamente menor no grupo treinado.

Por fim, ao observarmos que o grupo sedentário tem capacidade de fosforilação oxidativa maior comparado ao grupo treinado, além do processo de transformação tumoral mais agressivo, haja vista a maior velocidade de crescimento tumoral, com tamanho e massa tumoral significativamente maior comparado ao grupo treinado. Também verificamos que a massa pulmonar foi maior no grupo sedentário, assim como alterações morfológicas, que indicam o acometimento de nódulos metastáticos no tecido pulmonar. Corroborando, o restabelecimento da OXPHOS associado com a agressividade tumoral e consequentemente o surgimento de metástases foi demonstrada no estudo de Tan e colaboradores (2015), também com células 4T1, que demonstra a importância do metabolismo mitocondrial para o desenvolvimento tumoral e estabelecimento de metástases. Não obstante, esta condição de agressividade tumoral em conjunto com o reestabelecimento na capacidade de fosforilação oxidativa em células tumorais está em consonância com o quarto e último estágio de transformação tumorigênica proposto por Smolkova e colaboradores (2011) e Jose e colaboradores (Jose *et al.*, 2011). Portanto, as células cancerosas são altamente adaptáveis a estresses bioenergéticos (Rossignol *et al.*, 2004) e o processo de desenvolvimento tumoral constitui-se de transformações metabólicas caracterizadas por aumento na expressão de proteínas importantes para o metabolismo bioenergético, capazes de sustentar o fornecimento de energia até que o metabolismo mitocondrial seja reestabelecido (Jose *et al.*, 2011), condição esta que pode ser atrelada ao potencial metastático das células tumorais (Tan *et al.*, 2015).

Portanto, é plausível admitir que o exercício físico moderado foi eficaz na redução da tumorigênese e agressividade oriunda do TNBC e retardou a transformação metabólica

tumoral mantendo-a entre a primeira e segunda “onda” de transformação tumoral, com realce na via glicolítica. Enquanto o grupo sedentário demonstrou maior agressividade tumoral, verificada a partir do maior volume e massa tumoral, além de maior potencial bioenergético mitocondrial e surgimento de alterações morfológicas no tecido pulmonar, sugerindo o desenvolvimento de nódulos metastáticos.

Conteúdo lipídico do TNBC e Exercício Físico Aeróbico Moderado

A reprogramação metabólica é considerada uma característica comum do câncer. A proliferação descontrolada nos tumores exige muita energia e componentes de biomassa, a fim de expandir e disseminar (Beloribi-Djefalia *et al.*, 2016). Alterações no metabolismo lipídico são comuns em muitos tipos de câncer (Baumann *et al.*, 2013) e podem afetar numerosos processos celulares, incluindo crescimento celular, proliferação, diferenciação e motilidade (Santos e Schulze, 2012).

A análise do conteúdo lipídico no TNBC em nosso estudo não identificou diferenças entre os grupos sedentário e treinado para as concentrações de ácidos graxos ou fosfatidilinositol fosfato. Entretanto, foi possível identificar redução na concentração do ácido fosfatídico (PA) e da fosfatidilcolina (PC) no grupo treinado. A PC é o fosfolípido mais abundante nas membranas celulares eucarióticas e desempenha um duplo papel como componente estrutural das membranas e como substrato que produz os segundos mensageiros lipídicos, como o ácido fosfatídico (Vance e Vance, 2004; Bond, 2017). No câncer de mama triplo-negativo, a PC mostrou-se crucial para a sobrevivência de células MDA-MB-231 (Mori *et al.*, 2015) e sugere-se que a alta concentração de PC possa ser um preditivo de recorrência no TNBC (Hosokawa *et al.*, 2017) além de estar também envolvida com o processo metastático no TNBC (Abalsamo *et al.*, 2012). Por sua vez, o PA é descrito como um mensageiro lipídico capaz de modular vários processos celulares, como o tráfico de membrana, reorganização do citoesqueleto de actina, motilidade celular e proliferação celular (Zhang e Du, 2009; Bruntz *et al.*, 2014). Em células MDA-MB-231 o PA foi capaz de potencializar a capacidade de migração e invasão (Sliva *et al.*, 2000). Em modelo experimental transgênico de câncer de mama o PA promoveu metástase pulmonar através da regulação da membrana plasmática por meio de metaloproteinases (Wang *et al.*, 2017).

Adicionalmente, nossos resultados não apresentaram diferenças entre os grupos sedentário e treinado para a expressão de mRNA da acetil-CoA carboxilase, tanto a subunidade alfa como beta, que por sua vez estão envolvidas no mecanismo de lipogênese e consequente anabolismo. Contudo, as duas isoformas da enzima málica, tiveram aumento na

expressão relativa de mRNA mediante o exercício físico moderado. A enzima málica pode converter o malato, exportado da mitocôndria para o citosol, em piruvato, colaborando tanto com o metabolismo energético, como também para a formação de NADPH, fundamental para processos anabólicos relacionados a via das pentoses e formação de nucleotídeos (Wallace, 2012).

Sobretudo, destaca-se a capacidade do treinamento físico em reduzir tanto o PA como a PC, comumente elevados no câncer. Adicionalmente, ao considerar o desenvolvimento tumoral por meio de “ondas” de transformações metabólicas, a redução no volume tumoral superior a cinquenta por cento no grupo treinado em conjunto com a maior expressão da enzima málica, é razoável admitir que o exercício físico retardou o estágio de desenvolvimento tumoral, com impacto no crescimento tumoral.

Exercício Físico Aeróbico e Via Hippo

A via Hippo, descoberta em meados da década de 1990, tem recebido recentemente grande atenção a sua participação no processo de desenvolvimento tumoral, com grande foco na tumorigênese mamária (Shi *et al.*, 2015). No câncer de mama, a diminuição da expressão de mRNA dos supressores tumorais da via Hippo, Lats1 ou Lats2, leva ao aumento do tamanho do tumor e ocorrência de metástases (Visser e Yang, 2010).

Nossos resultados indicam que a via Hippo foi modulada pelo exercício físico aeróbico, com aumento significativo na expressão relativa de mRNA do gene Lats2. Corroborando, em pesquisa recente a respeito da via Hippo e exercício físico, utilizando modelo *cross-talking* de cultura celular e meio suplementado com soro de mulheres exercitadas, as células MCF-7, mas não MDA-MB-231, sofreram efeito supressivo do exercício físico mediado pela fosforilação de YAP e consequente inibição da via Hippo (Dethlefsen, Hansen, *et al.*, 2017).

Interessantemente, uma das possibilidades de controle da via Hippo está envolvida com o metabolismo energético, relacionado a homeostase da glicose e sustentação na atividade de YAP/TAZ (Totaro *et al.*, 2018), enquanto a escassez de glicose inibe a atividade de YAP/TAZ (Santinon *et al.*, 2016). Adicionalmente, a ativação de Akt e ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) aumenta a capacidade de YAP para promover a proliferação de células MCF10 (Totaro *et al.*, 2018) e consequentemente, a via mTOR também pode exercer influencia sobre a atividade de YAP/TAZ, com influência no tamanho e proliferação celular em resposta a nutrientes, fatores de crescimento e níveis de energia celular (Saxton e Sabatini, 2017). Vale ressaltar que nossos resultados demonstraram redução

na expressão de Mtor e nenhuma diferença na expressão de mRNA de Pten, IGF1R e IRS1, relacionados à estímulos de crescimento e proliferação celular.

Não obstante, a expressão elevada de YAP pode cooperar com a perda de p53 para promover o surgimento de cânceres com *status* de diferenciação alterado em relação à sua célula de origem (Furth *et al.*, 2018). Outras investigações também confirmam que a inativação do p53, ou perda combinada de p53 e Rb, no epitélio mamário resulta em carcinomas mamários que apresentam recorrentes amplificações de YAP (Cheng *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2016). Embora a capacidade de LATS2 em restringir a reprogramação seja independente do p53, a interação funcional entre LATS2 e p53 é necessária para manter a homeostase de células-tronco embrionárias (Aylon *et al.*, 2006). Corroborando, o silenciamento de YAP/TAZ no câncer ou linhagens de células-tronco, facilitam a ativação do p53 e a parada do crescimento celular (Xie *et al.*, 2013; Schutte *et al.*, 2014).

Além disso, LATS2 e p53 interagem por meio de *feedback* positivo para garantir a diferenciação celular ou responder ao estresse na replicação por promover a senescência celular (Furth *et al.*, 2018). É importante destacar que, em resposta ao estresse mitótico, LATS2 se liga e inibe o MDM2 e conseqüentemente ocorre a ativação do p53, que induz a parada do ciclo celular na fase G1/S (Furth *et al.*, 2018). Portanto, a coordenação da progressão do ciclo celular é influenciada pelo fornecimento de substratos energéticos necessários para a duplicação celular (Moncada *et al.*, 2012). Contudo, apesar desta condição ser comum tanto a células normais quanto neoplásicas e da glicólise ser fundamental para a proliferação celular, a glicólise sozinha não resulta em proliferação (Almeida *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2010; Tudzarova *et al.*, 2011; Moncada *et al.*, 2012).

Corroborando, descobrimos que o grupo treinado mostrou redução no conteúdo de PA, o que pode inibir a via Hippo em TNBC. Recentemente foi identificado que o PA é um regulador chave da via Hippo, cuja sinalização lipídica está relacionada com a ativação de YAP. Nesse sentido, PA pode se ligar diretamente a componentes da via Hippo, como LATS e NF2, inativando a via e permitindo a translocação de YAP para o núcleo e conseqüente ações em prol do crescimento e proliferação celular (Wang *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2018).

Por fim, nossos resultados demonstraram que o exercício físico aeróbico foi capaz de aumentar a expressão gênica de p53 e Lats2 em modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo. No fulcro da redução significativa da massa tumoral mediante o treinamento físico, é factível que a via de atuação do exercício físico na redução da tumorigênese no TNBC ocorra por modulação no eixo Hippo-p53, haja vista a capacidade de Lats2 e p53 em restringir o crescimento e proliferação celular. Não obstante, a capacidade do PA em inibir a

função de Lats2 e o fato de sua concentração estar reduzida no grupo treinado, sugere que a modulação da via Hippo seja possivelmente um ponto de atuação do exercício físico na redução da tumorigênese do câncer de mama triplo-negativo. Ademais, os dados coletados a partir da análise da expressão relativa de mRNA não permitem extrapolar para conclusões a cerca de interações proteicas pós-traducionais e efeitos metabólicos diretos sobre o metabolismo celular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, em modelo experimental murino de câncer de mama triplo-negativo, o exercício físico aeróbico moderado demonstrou ser capaz de reduzir o volume e massa tumoral. Além disso, o fato de iniciar o protocolo de treinamento após a indução tumoral também se mostrou benéfico na redução da tumorigênese, ao contrário da condição sedentária ou de interrupção do treinamento após a indução tumoral.

A análise do metabolismo tumoral indica que as mitocôndrias tem maior capacidade de fosforilação oxidativa na condição sedentária, enquanto o grupo treinado além de ter menor capacidade respiratória mitocondrial, demonstrou estar no limite de sua capacidade de de fosforilação oxidativa. Possivelmente, esta foi a condição que ocasionou a elevação na expressão de genes relacionados ao metabolismo glicolítico no grupo treinado. Tais alterações estão alinhadas com os estágios de transformação do metabolismo tumoral, cujo aumento na agressividade é constatada após o reestabelecimento da respiração mitocondrial em células 4T1.

A redução do desenvolvimento tumoral proporcionada pelo treinamento físico, aliada às alterações no metabolismo tumoral e aumento na expressão de supressores tumorais, Lats2 e p53, sugerem que o eixo Hippo-p53, comprovadamente sensível à privação de nutrientes, possa ser ativado pelo exercício físico aeróbico moderado. Adicionalmente, a redução de PA, um inibidor de Lats2, fortalece o indicativo do exercício físico atuar na ativação da via Hippo no câncer de mama triplo-negativo (Figura 19).

Figura 19 - Exercício Físico aeróbico moderado reduz o desenvolvimento tumoral em TNBC (4T1).

Ainda que extrapolações pós-traducionais não sejam possíveis a partir de dados da expressão relativa de mRNA, o conjunto de dados do nosso estudo abre novas perspectivas acerca de vias metabólicas sensíveis ao exercício físico, que por sua vez podem colaborar não apenas para o entendimento dos efeitos anti-tumorigênicos do exercício físico como também a melhor compreensão na biologia do câncer.

REFERÊNCIAS

- ABALSAMO, L. et al. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C results in loss of mesenchymal traits in metastatic breast cancer cells. **Breast Cancer Res**, v. 14, n. 2, p. R50, Mar 19 2012. ISSN 1465-5411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3151> >.
- ALIROL, E.; MARTINOU, J. C. Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4706-16, Aug 7 2006. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209600> >.
- ALMEIDA, A.; BOLANOS, J. P.; MONCADA, S. E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 2, p. 738-41, Jan 12 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913668107> >.
- ANDERS, C.; CAREY, L. A. Understanding and treating triple-negative breast cancer. **Oncology (Williston Park)**, v. 22, n. 11, p. 1233-9; discussion 1239-40, 1243, Oct 2008. ISSN 0890-9091 (Print)0890-9091. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ARDESTANI, A.; LUPSE, B.; MAEDLER, K. Hippo Signaling: Key Emerging Pathway in Cellular and Whole-Body Metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 29, n. 7, p. 492-509, Jul 2018. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2018.04.006> >.
- AUNG, L. H. H. et al. Mitochondrial protein 18 (MTP18) plays a pro-apoptotic role in chemotherapy-induced gastric cancer cell apoptosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 56582-56597, Aug 22 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17508> >.
- AVESEH, M.; NIKOOIE, R.; AMINAIE, M. Exercise-induced changes in tumour LDH-B and MCT1 expression are modulated by oestrogen-related receptor alpha in breast cancer-bearing BALB/c mice. **J Physiol**, v. 593, n. 12, p. 2635-48, Jun 15 2015. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jp270463> >.
- AYLON, Y. et al. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. **Genes Dev**, v. 20, n. 19, p. 2687-700, Oct 1 2006. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1447006> >.
- AYSOLA, K. et al. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. **Hereditary Genet**, v. 2013, n. Suppl 2, 2013. ISSN 2161-1041 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1041.s2-001> >.
- BAE, J. S.; KIM, S. M.; LEE, H. The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 16084-16098, Feb 28 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.14306> >.
- BALLARD-BARBASH, R. et al. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. **J Natl Cancer Inst**, v. 104, n. 11, p. 815-40, Jun 6 2012. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djs207> >.

BAO, Y. et al. Mammalian Hippo pathway: from development to cancer and beyond. **J Biochem**, v. 149, n. 4, p. 361-79, Apr 2011. ISSN 0021-924x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvr021> >.

BARBOSA, C. R. F. et al. Neoadjuvant therapy for breast cancer treatment: an expert panel recommendation from the Brazilian Society of Breast Surgeons 2018. **Breast Cancer Res Treat**, Aug 11 2018. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4912-x> >.

BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1856, n. 1, p. 73-85, Aug 2015. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.002> >.

BARTUCCI, M. et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 34, n. 6, p. 681-90, Feb 5 2015. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.5> >.

BAUMANN, J.; SEVINSKY, C.; CONKLIN, D. S. Lipid biology of breast cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 10, p. 1509-17, Oct 2013. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.03.011> >.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, p. e189, Jan 25 2016. ISSN 2157-9024 (Print)2157-9024. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2015.49> >.

BETOF, A. S. et al. Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. **J Natl Cancer Inst**, v. 107, n. 5, May 2015. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djv040> >.

BIANCO, T. M. et al. The influence of physical activity in the anti-tumor immune response in experimental breast tumor. **Immunol Lett**, v. 190, p. 148-158, Oct 2017. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.007> >.

BLAGIH, J. et al. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 41-54, Jan 20 2015. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.030> >.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-7, Aug 1959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/o59-099> >.

BOLAND, M. L.; CHOURASIA, A. H.; MACLEOD, K. F. Mitochondrial dysfunction in cancer. **Front Oncol**, v. 3, p. 292, Dec 2 2013. ISSN 2234-943X (Print)2234-943x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00292> >.

BOND, P. Phosphatidic acid: biosynthesis, pharmacokinetics, mechanisms of action and effect on strength and body composition in resistance-trained individuals. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, n. 1,

p. 12, 2017-02-06 2017. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-017-0166-6> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Sep 12 2018. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492> >.

BRETSCHER, M. S. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. **Nat New Biol**, v. 236, n. 61, p. 11-2, Mar 1 1972. ISSN 0090-0028 (Print)0090-0028. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRITSCHGI, A. et al. The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ERalpha. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 541-545, Jan 26 2017. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature20829> >.

BROWN, J. C. et al. Cancer, physical activity, and exercise. **Compr Physiol**, v. 2, n. 4, p. 2775-809, Oct 2012. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c120005> >.

BRUNTZ, R. C.; LINDSLEY, C. W.; BROWN, H. A. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 4, p. 1033-79, Oct 2014. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/pr.114.009217> >.

BUCK, M. D. et al. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 63-76, Jun 30 2016. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035> >.

CAMPBELL, K. L.; MCTIERNAN, A. Exercise and biomarkers for cancer prevention studies. **J Nutr**, v. 137, n. 1 Suppl, p. 161s-169s, Jan 2007. ISSN 0022-3166 (Print)0022-3166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jn/137.1.161S> >.

CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2014, n. 6, p. 655-8, Jun 2 2014. ISSN 1559-6095. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot073411> >.

CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Jama**, v. 295, n. 21, p. 2492-502, Jun 7 2006. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.21.2492> >.

CAVALLI, L. R.; VARELLA-GARCIA, M.; LIANG, B. C. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. **Cell Growth Differ**, v. 8, n. 11, p. 1189-98, Nov 1997. ISSN 1044-9523 (Print)1044-9523. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- CHEN, E. I. et al. Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. **Cancer Res**, v. 67, n. 4, p. 1472-86, Feb 15 2007. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3137> >.
- CHEN, Q. et al. A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 28, n. 5, p. 432-7, Mar 1 2014. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.233676.113> >.
- CHENG, L. et al. Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. **Oncogene**, v. 29, n. 42, p. 5700-11, Oct 21 2010. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.300> >.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-9, Apr 1987. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1987.9999> >.
- CLAGUE, J.; BERNSTEIN, L. Physical activity and cancer. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 6, p. 550-8, Dec 2012. ISSN 1523-3790. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11912-012-0265-5> >.
- COLOMBO, S. L. et al. Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 44, p. 18868-73, Nov 2 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1012362107> >.
- DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **J Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281-94, 2016. ISSN 1837-9664 (Print)1837-9664. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7150/jca.13141> >.
- DETHLEFSEN, C. et al. Exercise-Induced Catecholamines Activate the Hippo Tumor Suppressor Pathway to Reduce Risks of Breast Cancer Development. **Cancer Res**, v. 77, n. 18, p. 4894-4904, Sep 15 2017. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-3125> >.
- DETHLEFSEN, C.; PEDERSEN, K. S.; HOJMAN, P. Every exercise bout matters: linking systemic exercise responses to breast cancer control. **Breast Cancer Res Treat**, v. 162, n. 3, p. 399-408, Apr 2017. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-017-4129-4> >.
- DONG, L. F. et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. **Elife**, v. 6, Feb 15 2017. ISSN 2050-084x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.22187> >.
- ELKIN, E. B. et al. The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the U.S.: 1975-1999. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1149-57, Sep 15 2005. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ncr.21285> >.

ELSAWAF, Z.; SINN, H. P. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations. In: (Ed.). **Breast Care (Basel)**, v.6, 2011. p.273-8. ISBN 1661-3791 (Print)1661-3805 (Electronic).

ERHARDT, W. et al. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). **Res Exp Med (Berl)**, v. 184, n. 3, p. 159-69, 1984. ISSN 0300-9130 (Print)0300-9130. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERNANDO, P.; BONEN, A.; HOFFMAN-GOETZ, L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 71, n. 10-11, p. 854-7, Oct-Nov 1993. ISSN 0008-4212 (Print)0008-4212. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERREIRA, L. M.; HEBRANT, A.; DUMONT, J. E. Metabolic reprogramming of the tumor. **Oncogene**, v. 31, n. 36, p. 3999-4011, Sep 6 2012. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.576> >.

FERRER, R. A. et al. Exercise interventions for cancer survivors: a meta-analysis of quality of life outcomes. **Ann Behav Med**, v. 41, n. 1, p. 32-47, Feb 2011. ISSN 0883-6612. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12160-010-9225-1> >.

FIGUEIRA, A. C. C. et al. Efficacy of Exercise on Breast Cancer Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis of Preclinical Data. **Int J Sports Med**, v. 39, n. 5, p. 327-342, May 2018. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/s-0044-101149> >.

FRIEDENREICH, C. M.; NEILSON, H. K.; LYNCH, B. M. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 14, p. 2593-604, Sep 2010. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.028> >.

FULFORD, L. G. et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **Histopathology**, v. 49, n. 1, p. 22-34, Jul 2006. ISSN 0309-0167 (Print)0309-0167. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02453.x> >.

FURMANIAK, A. C.; MENIG, M.; MARKES, M. H. Exercise for women receiving adjuvant therapy for breast cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 9, p. Cd005001, Sep 21 2016. ISSN 1361-6137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005001.pub3> >.

FURTH, N.; AYLON, Y.; OREN, M. p53 shades of Hippo. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 1, p. 81-92, Jan 2018. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.163> >.

GALBRAITH, M. D. et al. CDK8 Kinase Activity Promotes Glycolysis. **Cell Rep**, v. 21, n. 6, p. 1495-1506, Nov 7 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.058> >.

GLASS, O. K. et al. Differential response to exercise in claudin-low breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 60, p. 100989-101004, Nov 24 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.21054> >.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 4, p. 165-73, Apr 2008. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.006> >.

GOH, J.; ENDICOTT, E.; LADIGES, W. C. Pre-tumor exercise decreases breast cancer in old mice in a distance-dependent manner. **Am J Cancer Res**, v. 4, n. 4, p. 378-84, 2014. ISSN 2156-6976 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GRAHAM, K. A. et al. NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 3, p. 223-31, Aug 1 2010. ISSN 1538-4047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUPPY, M. et al. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. 2002-05-15 2002. Disponível em: < <http://www.biochemj.org/content/364/1/309.long> >.

HAN, H. et al. Regulation of the Hippo Pathway by Phosphatidic Acid-Mediated Lipid-Protein Interaction. **Mol Cell**, v. 72, n. 2, p. 328-340.e8, Oct 18 2018. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.038> >.

HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309-22, Mar 20 2012. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022> >.

HARVIE, M.; HOWELL, A.; EVANS, D. G. Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, p. e66-73, 2015. ISSN 1548-8748. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e66 >.

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. 2009-05-22 2009. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/324/5930/1029> >.

HOJMAN, P. et al. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 3, p. E504-10, Sep 2011. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00520.2010> >.

HOSOKAWA, Y. et al. Recurrent triple-negative breast cancer (TNBC) tissues contain a higher amount of phosphatidylcholine (32:1) than non-recurrent TNBC tissues. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0183724, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183724> >.

INCA, I. N. D. C.-. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. 2018. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/> >. Acesso em: 02 out. 2018.

ISANEJAD, A. et al. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. **Life Sci**, v.

151, p. 30-40, Apr 15 2016. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.090> >.

JIA, D. et al. Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. **Cells**, v. 7, n. 3, Mar 13 2018. ISSN 2073-4409 (Print)2073-4409. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/cells7030021> >.

JIANG, D. et al. Analysis of p53 transactivation domain mutants reveals Acad11 as a metabolic target important for p53 pro-survival function. **Cell Rep**, v. 10, n. 7, p. 1096-109, Feb 24 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.043> >.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1792, Jun 18 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.162> >.

JONES, L. W. et al. Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 18, p. 6695-8, Sep 15 2005. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-0844> >.

_____. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. **J Appl Physiol** (1985), v. 108, n. 2, p. 343-8, Feb 2010. ISSN 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00424.2009> >.

JONES, R. A. et al. RB1 deficiency in triple-negative breast cancer induces mitochondrial protein translation. **J Clin Invest**, v. 126, n. 10, p. 3739-3757, Oct 3 2016. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci81568> >.

JOSE, C.; BELLANCE, N.; ROSSIGNOL, R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? **Biochim Biophys Acta**, v. 1807, n. 6, p. 552-61, Jun 2011. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.012> >.

JOVANOVIĆ, I. et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 7, p. 1902-12, Jul 2011. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141417> >.

JUSTUS, C. R.; SANDERLIN, E. J.; YANG, L. V. Molecular Connections between Cancer Cell Metabolism and the Tumor Microenvironment. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 5, p. 11055-86, May 15 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160511055> >.

KATZKE, V. A.; KAAKS, R.; KUHN, T. Lifestyle and cancer risk. **Cancer J**, v. 21, n. 2, p. 104-10, Mar-Apr 2015. ISSN 1528-9117. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ppo.0000000000000101> >.

KHORI, V. et al. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. **European Journal of Pharmacology**, v.

765, p. 179-187, 2015/10/15/ 2015. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001429991530203X> >.

KOELWYN, G. J. et al. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 10, p. 620-632, Sep 25 2017. ISSN 1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.78> >.

_____. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 10, p. 620, 2017-09-25 2017. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrc.2017.78> >.

KRAMER, P. A. et al. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. **Redox Biol**, v. 2, p. 206-10, 2014. ISSN 2213-2317 (Print)2213-2317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.026> >.

KRUK, J. Lifestyle components and primary breast cancer prevention. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 24, p. 10543-55, 2014. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LAMAR, J. M. et al. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 37, p. E2441-50, Sep 11 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1212021109> >.

LI, C. et al. A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. **Nat Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 106-119, Feb 2017. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3464> >.

LIU, W. et al. Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice. **J Neurosci Res**, v. 90, n. 6, p. 1183-9, Jun 2012. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23016> >.

LOPRINZI, P. D. et al. Physical activity and the risk of breast cancer recurrence: a literature review. **Oncol Nurs Forum**, v. 39, n. 3, p. 269-74, May 1 2012. ISSN 0190-535x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1188/12.onf.269-274> >.

MA, W. et al. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 3, p. 243-6, Jun 2007. ISSN 0145-479X (Print)0145-479x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-007-9083-0> >.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 24 2008. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature07205> >.

MAO, B. et al. Hippo signaling in stress response and homeostasis maintenance. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 47, n. 1, p. 2-9, Jan 2015. ISSN 1672-9145. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmu109> >.

MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 1-2, p. 303-15, Jun 2013. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3> >.

MARIN-VALENCIA, I. et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. **Cell Metab**, v. 15, n. 6, p. 827-37, Jun 6 2012. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.001> >.

MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650-3, Jun 16 2006. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1126863> >.

MAUGERI-SACCA, M.; DE MARIA, R. Hippo pathway and breast cancer stem cells. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 99, p. 115-22, Mar 2016. ISSN 1040-8428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.004> >.

MAYCOTTE, P. et al. Mitochondrial dynamics and cancer. **Tumour Biol**, v. 39, n. 5, p. 1010428317698391, May 2017. ISSN 1010-4283. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1010428317698391> >.

MCTIERNAN, A. Mechanisms linking physical activity with cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 3, p. 205-11, Mar 2008. ISSN 1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2325> >.

MEITZLER, J. L. et al. NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 17, p. 2873-89, Jun 10 2014. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5603> >.

MISHRA, S. I. et al. Are exercise programs effective for improving health-related quality of life among cancer survivors? A systematic review and meta-analysis. **Oncol Nurs Forum**, v. 41, n. 6, p. E326-42, Nov 1 2014. ISSN 0190-535x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1188/14.onf.e326-e342> >.

MOLANOURI SHAMSI, M. et al. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF-alpha ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. **Cytokine**, v. 90, p. 100-108, Feb 2017. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.11.005> >.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A.; COLOMBO, S. L. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. **Biochem J**, v. 446, n. 1, p. 1-7, Aug 15 2012. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1042/bj20120427> >.

MORAIS, R. et al. Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. **Cancer Res**, v. 54, n. 14, p. 3889-96, Jul 15 1994. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MORENO-SANCHEZ, R. et al. Energy metabolism in tumor cells. **Febs j**, v. 274, n. 6, p. 1393-418, Mar 2007. ISSN 1742-464X (Print)1742-464x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x> >.

_____. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. **Febs j**, v. 283, n. 1, p. 54-73, Jan 2016. ISSN 1742-464x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13535> >.

MORI, N. et al. Choline kinase-alpha protein and phosphatidylcholine but not phosphocholine are required for breast cancer cell survival. **NMR Biomed**, v. 28, n. 12, p. 1697-706, Dec 2015. ISSN 0952-3480. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/nbm.3429> >.

MURPHY, E. A. et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. **Cytokine**, v. 55, n. 2, p. 274-279, 2011/08/01/ 2011. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104346661100127X> >.

NAKASHIMA, R. A.; PAGGI, M. G.; PEDERSEN, P. L. Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. **Cancer Res**, v. 44, n. 12 Pt 1, p. 5702-6, Dec 1984. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAROD, S. Tumour size predicts long-term survival among women with lymph node-positive breast cancer. In: (Ed.). **Curr Oncol**, v.19, 2012. p.249-53. ISBN 1198-0052 (Print)1718-7729 (Electronic).

PANAGOPOULOS, V. et al. Inflammatory peroxidases promote breast cancer progression in mice via regulation of the tumour microenvironment. **Int J Oncol**, v. 50, n. 4, p. 1191-1200, Apr 2017. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2017.3883> >.

PAVLIDES, S. et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984-4001, Dec 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.23.10238> >.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. **Cell Metab**, v. 23, n. 1, p. 27-47, Jan 12 2016. ISSN 1550-4131 (Print)1932-7420 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006> >.

PEDERSEN, L.; CHRISTENSEN, J. F.; HOJMAN, P. Effects of exercise on tumor physiology and metabolism. **Cancer J**, v. 21, n. 2, p. 111-6, Mar-Apr 2015. ISSN 1528-9117. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ppo.0000000000000096> >.

PEDERSEN, L. et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 554-562, 2016/03/08/ 2016. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413116300031> >.

PERPER, R. J.; ZEE, T. W.; MICKELSON, M. M. Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. **J Lab Clin Med**, v. 72, n. 5, p. 842-8, Nov 1968. ISSN 0022-2143 (Print)0022-2143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. **Methods Mol Biol**, v. 810, p. 25-58, 2012. ISSN 1064-3745. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3 >.

PURUSHOTHAMAN, D.; SARIN, A. Cytokine-dependent regulation of NADPH oxidase activity and the consequences for activated T cell homeostasis. **J Exp Med**, v. 206, n. 7, p. 1515-23, Jul 6 2009. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20082851> >.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-37, Nov 2013. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3394> >.

RAMIREZ DE MOLINA, A. et al. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. **Oncogene**, v. 21, n. 27, p. 4317-22, Jun 20 2002. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1205556> >.

RASHIDIAN, J. et al. Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression. **Sci Signal**, v. 8, n. 363, p. ra14, Feb 10 2015. ISSN 1945-0877. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2005735> >.

ROHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 11, p. 732-749, Nov 2016. ISSN 1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.89> >.

ROSSIGNOL, R. et al. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 3, p. 985-93, Feb 1 2004. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RUIZ-CASADO, A. et al. Exercise and the Hallmarks of Cancer. **Trends Cancer**, v. 3, n. 6, p. 423-441, Jun 2017. ISSN 2405-8025. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.007> >.

SANTINON, G.; POCATERRA, A.; DUPONT, S. Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 4, p. 289-299, Apr 2016. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.11.004> >.

SANTOS, C. R.; SCHULZE, A. Lipid metabolism in cancer. **Febs j**, v. 279, n. 15, p. 2610-23, Aug 2012. ISSN 1742-464x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x> >.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960-976, Mar 9 2017. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004> >.

SCATENA, R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. **Adv Exp Med Biol**, v. 942, p. 287-308, 2012. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_13 >.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-82, Jun 28 2012. ISSN 1548-7091. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019> >.

SCHMIDT, M. E. et al. Association of pre-diagnosis physical activity with recurrence and mortality among women with breast cancer. **Int J Cancer**, v. 133, n. 6, p. 1431-40, Sep 15 2013. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28130> >.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101, 2008-06-05 2008. ISSN 1750-27991750-2799. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.73> >.

SCHMITZ, K. H. et al. Controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 7, p. 1588-95, Jul 2005. ISSN 1055-9965 (Print)1055-9965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-04-0703> >.

SCHUTTE, U. et al. Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. **Transl Oncol**, v. 7, n. 2, p. 309-21, Apr 2014. ISSN 1936-5233 (Print)1936-5233. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2014.02.005> >.

SCOTT, J. M. et al. Modulation of anthracycline-induced cardiotoxicity by aerobic exercise in breast cancer: current evidence and underlying mechanisms. **Circulation**, v. 124, n. 5, p. 642-50, Aug 2 2011. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.111.021774> >.

SENFT, D.; RONAI, Z. A. Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 39, p. 43-52, Apr 2016. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.001> >.

SHALAMZARI, S. A. et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. In: (Ed.). **Iran J Basic Med Sci**, v.17, 2014. p.231-58. ISBN 2008-3866 (Print)2008-3874 (Electronic).

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. ATP controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidising palmitoyl-carnitine, and the inhibition of citrate synthase by ATP. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 22, n. 1, p. 89-93, Jan 4 1966. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHI, P.; FENG, J.; CHEN, C. Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 47, n. 1, p. 53-9, Jan 2015. ISSN 1672-9145. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmu114> >.

SIHTO, H. et al. Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 5, p. R87, Sep 13 2011. ISSN 1465-5411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2944> >.

SLIVA, D. et al. Enhancement of the migration of metastatic human breast cancer cells by phosphatidic acid. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 268, n. 2, p. 471-9, Feb 16 2000. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.2111> >.

SMOLKOVA, K. et al. Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. **J Bioenerg Biomembr**, v. 42, n. 1, p. 55-67, Feb 2010. ISSN 0145-479x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-009-9267-x> >.

_____. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 7, p. 950-68, Jul 2011. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2010.05.003> >.

SONVEAUX, P. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.118, 2008. p.3930-42. ISBN 0021-9738 (Print)1558-8238 (Electronic).

SPECK, R. M. et al. An update of controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **J Cancer Surviv**, v. 4, n. 2, p. 87-100, Jun 2010. ISSN 1932-2259. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11764-009-0110-5> >.

TAN, A. S. et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. **Cell Metab**, v. 21, n. 1, p. 81-94, Jan 6 2015. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.003> >.

THOMPSON, H. J. Effect of exercise intensity and duration on the induction of mammary carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 54, n. 7 Suppl, p. 1960s-1963s, Apr 1 1994. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TOTARO, A.; PANCIERA, T.; PICCOLO, S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. **Nat Cell Biol**, v. 20, n. 8, p. 888-899, Aug 2018. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0142-z> >.

TUDZAROVA, S. et al. Two ubiquitin ligases, APC/C-Cdh1 and SKP1-CUL1-F (SCF)-beta-TrCP, sequentially regulate glycolysis during the cell cycle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 13, p. 5278-83, Mar 29 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102247108> >.

TURLEY, S. J.; CREMASCO, V.; ASTARITA, J. L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 11, p. 669-82, Nov 2015. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri3902> >.

VAISBERG, M.; MELLO, M. T. D. **Exercícios na Saúde e na Doença**. Barueri: Manole, 2010.

VANCE, J. E.; VANCE, D. E. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. **Biochem Cell Biol**, v. 82, n. 1, p. 113-28, Feb 2004. ISSN 0829-8211 (Print)0829-8211. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/o03-073> >.

VAZQUEZ, F. et al. PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 287-301, Mar 18 2013. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020> >.

VIALE, A. et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 628-32, Oct 30 2014. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature13611> >.

VISSER, S.; YANG, X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 19, p. 3892-903, Oct 1 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.19.13386> >.

VYAS, S.; ZAGANJOR, E.; HAIGIS, M. C. Mitochondria and Cancer. **Cell**, v. 166, n. 3, p. 555-566, Jul 28 2016. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002> >.

WAI, T.; LANGER, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. **Trends Endocrinol Metab**, v. 27, n. 2, p. 105-17, Feb 2016. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001> >.

WALLACE, D. C. Mitochondria and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 10, p. 685-98, Oct 2012. ISSN 1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3365> >.

WANG, P. Y.; ZHUANG, J.; HWANG, P. M. p53: exercise capacity and metabolism. **Curr Opin Oncol**, v. 24, n. 1, p. 76-82, Jan 2012. ISSN 1040-8746. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/CCO.0b013e32834de1d8> >.

WANG, X. et al. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 109 Suppl 1, p. 153-9, May 2009. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05867.x> >.

WANG, Z. et al. Binding of PLD2-Generated Phosphatidic Acid to KIF5B Promotes MT1-MMP Surface Trafficking and Lung Metastasis of Mouse Breast Cancer Cells. **Dev Cell**, v. 43, n. 2, p. 186-197.e7, Oct 23 2017. ISSN 1534-5807. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.012> >.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 24 1956. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. **J Gen Physiol**, v. 8, n. 6, p. 519-30, Mar 7 1927. ISSN 0022-1295 (Print)0022-1295. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WEI, C.; WANG, Y.; LI, X. The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis. In: (Ed.). **Onco Targets Ther**, v.11, 2018. p.2185-93. ISBN 1178-6930 (Electronic).

WEINBERG, F.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial metabolism and cancer. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1177, p. 66-73, Oct 2009. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05039.x> >.

WHITESIDE, T. L. et al. Mechanisms of tumor escape from the immune system: Adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs. **Bulletin du Cancer**, v. 98, n. 2, p. E25-E31, 2011/02/01/ 2011. ISSN 0007-4551. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007455115306925> >.

WHO, W. H. O.-. Cancer today 2018. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/today/home> >. Acesso em: 02 out. 2018.

WIGGINS, J. M. et al. Exercise and the Tumor Microenvironment: Potential Therapeutic Implications. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 46, n. 1, p. 56-64, Jan 2018. ISSN 0091-6331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1249/jes.0000000000000137> >.

WIRTZ, P.; BAUMANN, F. T. Physical Activity, Exercise and Breast Cancer - What Is the Evidence for Rehabilitation, Aftercare, and Survival? A Review. **Breast Care (Basel)**, v. 13, n. 2, p. 93-101, Apr 2018. ISSN 1661-3791 (Print)1661-3791. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000488717> >.

WITKIEWICZ, A. K. et al. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. **Cell Cycle**, v. 11, n. 6, p. 1108-17, Mar 15 2012. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.6.19530> >.

WU, M. et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, n. 1, p. C125-36, Jan 2007. ISSN 0363-6143 (Print)0363-6143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00247.2006> >.

XIE, Q. et al. YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence. **Cancer Res**, v. 73, n. 12, p. 3615-24, Jun 15 2013. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-3793> >.

YAO, H. et al. Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? In: (Ed.). **Oncotarget**, v.8, 2017. p.1913-24. ISBN 1949-2553 (Electronic).

YEO, S. K.; GUAN, J. L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? **Trends Cancer**, v. 3, n. 11, p. 753-760, Nov 2017. ISSN 2405-8025. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.001> >.

ZHANG, Q. B. et al. Moderate swimming suppressed the growth and metastasis of the transplanted liver cancer in mice model: with reference to nervous system. **Oncogene**, v. 35, n. 31, p. 4122-31, Aug 4 2016. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.484> >.

ZHANG, Y.; DU, G. Phosphatidic acid signaling regulation of Ras superfamily of small guanosine triphosphatases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 9, p. 850-5, Sep 2009. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.05.013> >.

ZHENG, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). In: (Ed.). **Oncol Lett**, v.4, 2012. p.1151-7. ISBN 1792-1074 (Print)1792-1082 (Electronic).

ZIELINSKI, M. R. et al. Influence of chronic moderate sleep restriction and exercise on inflammation and carcinogenesis in mice. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 4, p. 672-9, May 2012. ISSN 0889-1591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.03.002> >.

ZONG, W. X.; RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Mitochondria and Cancer. **Mol Cell**, v. 61, n. 5, p. 667-676, Mar 3 2016. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011> >.

ZU, X. L.; GUPPY, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 3, p. 459-465, 2004/01/16/ 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0302504X> >.

ZUNTZ, N. Ueber die Bedeutung der verschiedenen Nährstoffe als Erzeuger der Muskelkraft. **Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. v. 83, n. n. 10-12, , p. p. 557-571, 1901.