UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a regulação dos microRNAs no
tumor do câncer de cólon

Gabriel Cardial Tobias

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a regulação dos microRNAs no
tumor do câncer de cólon

Gabriel Cardial Tobias

São Paulo

2021

GABRIEL CARDIAL TOBIAS

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a regulação dos microRNAs no
tumor do câncer de cólon

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof^a. Dr^a. Edilamar Menezes de Oliveira

São Paulo

2021

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Tobias, Gabriel Cardial
Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a regulação dos
microRNAs no tumor do câncer de cólon/ Gabriel Cardial Tobias. – São
Paulo : [s.n.], 2021.
258p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte
da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

1. Exercício físico 2. Câncer de cólon 3. microRNAs 4.
Exossomos I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TOBIAS, Gabriel Cardial

Título: Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a regulação dos microRNAs no tumor do câncer de cólon

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Edilamar Menezes de Oliveira por me aceitar em seu laboratório mesmo sabendo das minhas limitações e imperfeições, e por sempre acrescentar muito para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço pela orientação durante todo o processo do doutorado e pelo constante empenho para desenvolver nossa área de atuação, seja como pesquisadora, comunicadora ou mentora.

Ao professor David Lyden, com quem tive a sorte de trabalhar durante o doutorado e que me proporcionou enorme amadurecimento científico e profissional. Obrigado pelos conselhos e por me motivar a continuar trabalhando com todo o rigor possível.

Ao meu avô Carlos, à minha avó Terezinha, à minha tia Monica e à minha tia Iris por terem cuidado de mim, por sempre me derem amor e carinho e por terem me ensinado sobre valores, moral e ética. Sem vocês eu só seria mais um ser humano perdido pelo mundo.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da EEFÉ-USP, André, Camila, Noemy, Úrsula, Lucas, Tiago, Bruno, Felipe, Marcelo, Matheus, Janaina e Vanessa. Agradeço por terem me aceitado da maneira que sou, pelas incontáveis risadas e pelas conversas aleatórias e sem sentido do dia-a-dia. Vocês, pela primeira vez, ensinaram-me o valor da amizade.

To all friends from Lyden' Lab: Fanny, Linda, Serena, Shani, Samer, Inbal, Irina, Gang, Jianlong, Haiying, Michele, Candia, Laura, Pernille and Jean. Thanks to you, I had a life-changing experience in New York. I'm also thankful to all other friends and colleagues from Weill Cornell Medicine.

Ao João por ser esse companheiro diário de trabalho, por sempre estar disposto à ajudar e por ser o exemplo de uma pessoa calma, paciente, sensata, humilde e educada.

Ao Ney pelas incontáveis conversas sobre filosofia e sobre a vida, as quais me ajudaram a perceber a quão bela e trágica a vida pode ser.

Aos secretários da CPG-EEFE, Márcio e Cláudia por estarem sempre disponíveis para sanar qualquer dúvida e auxiliar na resolução de problemas. Se temos um programa de excelência, devemos em grande parte ao trabalho de vocês.

Aos técnicos Ney e Luciano por darem todo o suporte ao laboratório.

À EEFÉ-USP, onde fiz minha graduação (2008-2012) e mestrado (2015-2017).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante todo o processo no Brasil (processo 2018/02351-9) e no exterior com a bolsa BEPE-FAPESP (processo 2019/07117-9) - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Sou um homem doente... Sou mau. Não tenho atrativos. Acho que sofro do fígado. Aliás, não entendo bulhufas da minha doença e não sei com certeza o que é que me dói. Não me trato, nunca me tratei, embora respeite os médicos e a medicina. Além de tudo, sou supersticioso ao extremo; bem, o bastante para respeitar a medicina. (Tenho instrução suficiente para não ser supersticioso, mas sou.) Não, senhores, se não quero me tratar é de raiva. Isso os senhores provavelmente não compreendem. Que assim seja, mas eu compreendo. Certamente, não poderia explicar a quem exatamente eu atinjo, nesse caso, com a minha raiva; sei perfeitamente que, não me tratando, não posso prejudicar os médicos; sei perfeitamente bem que, com isso, prejudico somente a mim e a mais ninguém. Mesmo assim, se não me trato, é de raiva. Se o fígado dói, que doa ainda mais.”

Fiódor Dostoiévski

PRÓLOGO

Durante os 3 anos e 2 meses de realização deste doutorado, foram realizados dois projetos diferentes, os quais serão apresentados neste documento. O projeto principal sobre os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a regulação dos microRNAs no tumor do câncer de cólon, o qual foi proposto para o ingresso no doutorado e apresentado no exame de qualificação, será o projeto apresentado no momento da defesa de doutorado. O segundo projeto (a partir da página 120) sobre os efeitos do treinamento físico sobre a liberação, conteúdo e organotropismo dos exossomos derivados de diferentes órgãos e do sangue, desenvolvido durante o período de estágio no exterior (BEPE-FAPESP) no laboratório do Professor Doutor David Lyden, será a tese apresentada apenas neste documento de forma resumida.

RESUMO

TOBIAS, GABRIEL CARDIAL. **Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a regulação dos microRNAs no tumor do câncer de cólon.** 2021. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2021

O treinamento físico aeróbio reduz a incidência de diversos tipos de câncer humano e atenua o crescimento tumoral e a metástase em diferentes modelos de câncer em animais. Entretanto, existe uma lacuna na literatura sobre os mecanismos moleculares pelos quais treinamento físico aeróbio reduz o crescimento tumoral. MicroRNAs são frequentemente encontrados desregulados em tumores de cólon, e sua desregulação está associada com a progressão tumoral e pior prognóstico do paciente. Entretanto, é desconhecido se o treinamento físico aeróbio modula os microRNAs tumorais desregulados, promovendo atenuação do crescimento tumoral. Aqui, nós observamos que o treinamento físico reduziu o crescimento tumoral do câncer de cólon CT26 e MC38, reduziu o consumo de exossomos derivados das células CT26 pelas regiões metastática, reduziu a metástase pulmonar e aumentou a sobrevida dos animais. Mais importante, os efeitos do treinamento físico sobre a redução do crescimento tumoral também foi observado em camundongos imunodeficientes NUDE. Tanto o fragmentos tumoral CT26 quanto as células CT26 primárias provenientes dos camundongos treinados apresentaram um menor crescimento tumoral em comparação aos fragmentos tumorais e células CT26 primárias provenientes dos camundongos sedentários. Além disso, nós encontramos que o treinamento físico reduziu os efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor CT26, com a redução da esplenomegalia, atenuação do aumento da massa do fígado e atenuação da perda de massa do gastrocnêmio. Mecanicamente, o treinamento físico reduziu globalmente a expressão dos microRNAs nos tumores CT26. Esses resultados foram acompanhados por uma redução nos níveis de expressão de Dicer e Xpo5 nos tumores e nas células CT26 primárias. Por fim, nós observamos que menores níveis de expressão de Dicer e, em menor magnitude, de Xpo5 nos tumores de pacientes com câncer de cólon estão associado com uma maior sobrevida.

Palavras-chave: Treinamento físico aeróbio. Câncer de colón. microRNA. Dicer. Xpo5.

ABSTRACT

TOBIAS, GABRIEL CARDIAL. **Effects of exercise training on microRNA regulation in colon cancer**. 2021. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2021

Aerobic exercise reduces the incidence of several types of human cancer and decreases tumor growth and metastasis in different animal models. However, the mechanisms underlying these effects are not fully understood. MicroRNAs are often deregulated in colon tumors, and their dysregulation is associated with tumor progression and worse patient prognosis. However, it is unknown whether exercise training affects deregulated microRNAs decreasing tumor growth. Here, we observed that aerobic exercise training reduced CT26 and MC38 tumor growth, reduced CT26 exosomes uptake in distant pre-metastatic niches, reduced lung metastasis and increased animal survival. More importantly, exercise training also reduced tumor growth in immunodeficient NUDE mice. Both the tumor fragments and primary CT26 cells of the trained mice promoted less tumor growth. In addition, we found that exercise training reduced the systemic effects induced by the CT26 tumor, with the reduction of splenomegaly, attenuation of increased liver mass and attenuation of gastrocnemius mass loss. Mechanically, exercise training leads to a global decrease in the microRNA's expression in CT26 tumors. These results were accompanied by a reduction in the levels of Dicer and Xpo5 expression in tumors and in the CT26 cells. Finally, we found that lower levels of Dicer expression and, to a lesser extent, Xpo5 in colon tumors of patients are associated with longer patient survival.

Keywords: Aerobic exercise training. Colon cancer. microRNA. Dicer. Xpo5.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Drogas que podem interferir com cada uma das capacidades adquiridas necessárias para o crescimento e progressão tumoral. Adaptado de Hanahan e Weinberg ⁴².....4
- Figura 2. Estimativas no mundo em 2018 para os 15 tipos de câncer com maior mortalidade e incidência e para homens e mulheres. GLOBOCAN 2018 (<https://gco.iarc.fr/>).....8
- Figura 3. Efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral. A: Desenho Experimental. B: Volume tumoral durante o curso temporal. C: Porcentagem de camundongos sem tumor. D: Intensidade de luciferase pós 1 e 6 dias da injeção das células tumorais. E: Imagem mostrando o ensaio de luciferase. F: Sobrevida dos camundongos sedentários e treinados injetados com as células CT26. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas Log-rank para o surgimento tumoral e sobrevida, e análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; p*** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$36
- Figura 4. Efeitos do treinamento físico sobre as alterações sistêmicas do tumor CT26. Os camundongos foram sacrificados individualmente quando o tumor atingiu, aproximadamente, 600 mm³. A: Desenho Experimental. B: Volume tumoral. C: Massa tumoral. D: Massa do tibial anterior (TA). E: Massa do sóleo. F: Massa do gastrocnêmio. G: massa do baço. H: Massa do fígado. I: Massa do coração. J: massa do tecido adiposo branco. K: Massa do tecido adiposo marrom. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste t de Student para dados não pareados bicaudal e a ANOVA de um fator. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$38
- Figura 5. Efeitos persistentes do treinamento físico sobre o crescimento tumoral. A: Desenho experimental para o enxerto tumoral. B: Crescimento tumoral do enxerto proveniente do tumor dos animais SED+CT26 e dos animais TR+CT26. Primeira passagem (f1). C: Crescimento tumoral do enxerto proveniente do tumor dos animais f1SED+CT26 e dos animais f1TR+CT26. Segunda passagem (f2). D: Desenho experimental para a geração das células CT26 primárias. E: Crescimento tumoral das células tumorais proveniente do tumor dos animais f2SED+CT26 e dos animais f2TR+CT26. Primeira passagem (c1). F: Crescimento tumoral das células tumorais proveniente do tumor dos animais c1SED+CT26 e dos animais c1TR+CT26. Segunda passagem (c2). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada a análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$41
- Figura 6. Efeitos do treinamento físico sobre as células tumorais CT26. A: Desenho experimental. B: Volume tumoral durante o curso temporal. C: Massa tumoral. D: Porcentagem de camundongos sem tumor. E: Massa corporal pré e após as 8 semanas de treinamento físico. F: Delta da massa corporal considerando o dia da injeção das células tumorais e o momento do sacrifício dos camundongos. A massa tumoral foi descontada para as análises. G: massa do

tecido adiposo branco. H: Massa do fígado. I: massa do baço. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal, Log-rank para o surgimento tumoral, ANOVA de um fator e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.....43

Figura 7: Efeitos do treinamento físico sobre as células tumorais CT26. A: Desenho experimental para a geração das células CT26 primárias. As células tumorais primárias foram geradas individualmente de cada um dos tumores dos camundongos sedentários e treinados (denominadas como células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26). Após as células CT26 primárias terem sido geradas, elas foram injetadas em camundongos imunocompetentes Balb/c e em camundongos imunodeficientes NUDE. B: Volume tumoral durante o curso temporal para os camundongos imunocompetentes Balb/c e gráfico demonstrando o crescimento individual dos tumores. C: Volume tumoral durante o curso temporal para os camundongos imunodeficientes NUDE e gráfico demonstrando o crescimento individual dos tumores. D: Intensidade de luciferase dos tumores *ex vivo* crescidos nos camundongos imunodeficientes e imagem mostrando o ensaio de luciferase. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.....45

Figura 8: Efeitos do treinamento físico sobre as células tumorais CT26. A: Ensaio de viabilidade celular por MTT das células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26. B: Ensaio de formação de colônias das células tc1SED+CT26 e tcTR+CT26. C: Ensaio de migração em transwell das células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26. Intensidade de luciferase das células que migraram e imagem mostrando o ensaio de luciferase. D: Análise de RT-qPCR das células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26 para marcadores relacionados à proliferação celular. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001. E: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>). F: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Colon Adenocarcinoma – TCGA – 286 – rsem – tcgars” (<http://r2.amc.nl>). G: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>). H: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Colon CIT (Combat) –

Marisa – 566 – rma – u133p2” (<http://r2.amc.nl>). I: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi calculada com ULCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) utilizando amostras de pacientes com câncer de cólon do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).47

Figura 9. Efeitos do treinamento físico em camundongos imunodeficientes NUDE sobre crescimento tumoral CT26. A: Desenho experimental. B: Volume tumoral durante o curso temporal. C: Volume tumoral ex vivo. D: Massa tumoral. E: Intensidade da luciferase tumoral durante o curso temporal. F: Massa corporal durante todo o protocolo experimental, descontando-se a massa tumoral no momento do sacrifício. G: Delta da massa corporal considerando o dia da injeção das células tumorais e o momento do sacrifício dos camundongos. A massa tumoral foi descontada para as análises. H: Massa do baço. I: massa do fígado. J: massa do coração. J: massa do coração. K: massa do músculo tibial anterior (TA). L: Massa do tecido adiposo branco (WAT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.49

Figura 10: Efeitos do treinamento físico sobre a formação de metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26. A: Desenho experimental para o protocolo de remoção do tumor. B: Volume tumoral até o dia da remoção do tumor. C: Intensidade da luciferase tumoral 11 dias após a injeção das células tumorais e imagem mostrando o ensaio de luciferase. D: Delta da massa corporal do momento da injeção das células tumorais até o dia da remoção do tumor. E: Massa corporal durante todo o protocolo experimental. Massa tumoral. F: Massa do coração. G: Massa do fígado. H: massa do baço. I: Massa do tibial anterior (TA). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.51

Figura 11: Efeitos do treinamento físico sobre a formação de metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26. A: Intensidade da luciferase no pulmão, *in vivo*, após 4 dias da remoção do tumor. As setas pretas indicam as metástases pulmonares. B: Intensidade da luciferase no pulmão, *ex vivo*, após 9 dias da remoção do tumor. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.....53

Figura 12: Efeitos do treinamento físico sobre a formação de metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26. A: Massa pulmonar dos camundongos sacrificados individualmente com 1000mm³. B: Intensidade da luciferase no pulmão, *ex vivo*, dos camundongos sacrificados individualmente com 1000mm³ e imagem do ensaio de luciferase. C: Massa pulmonar dos camundongos sacrificados individualmente com 600mm³ e RT-qPCR para luciferase do pulmão. D: Massa pulmonar dos camundongos imunodeficientes NUDE. E: Massa pulmonar

dos camundongos que foi realizado a geração das células CT26 primárias a partir de cada um dos tumores individualmente. F: Massa pulmonar dos camundongos injetados com as células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26. Os gráficos de volume tumoral indicam a origem da amostra analisada. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e a ANOVA de um fator. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.....55

Figura 13: Efeitos do treinamento físico sobre o consumo de exossomos derivados das células CT26. A: Desenho experimental. B: Análise de biodistribuição dos exossomos derivados das células CT26 injetados em camundongos treinados por 4 semanas. A injeção dos exossomos foi realizada 24 horas após a última sessão de treino. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a injeção dos exossomos e os tecidos inteiros foram analisados pelo Odyssey. C: Análise de biodistribuição dos exossomos derivados das células CT26 injetados imediatamente após uma única sessão aguda de exercício. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a injeção dos exossomos e os tecidos inteiros foram analisados pelo Odyssey. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.....58

Figura 14: Efeitos do treinamento físico sobre a liberação de exossomos derivados das células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas”. A: Gráfico representativo das análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) de 1 células CT26 primária “sedentária” (tc1SED+CT26) e de 1 célula CT26 primárias “treinada” (tc1TR+CT26) mostrando a concentração e tamanho dos exossomos. B: Imagens representativas de microscopia eletrônica de 1 células CT26 primária “sedentária” (tc1SED+CT26) e de 1 célula CT26 primárias “treinada” (tc1TR+CT26). C: Concentração de exossomos por 10⁶ células. D: Tamanho dos exossomos. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.60

Figura 15: Efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral MC38. A: Desenho experimental. B: Volume tumoral durante o curso temporal. C: Massa tumoral. D: Porcentagem de camundongos sem tumor. E: Massa corporal durante todo o protocolo experimental. F: Massa do pulmão. G: Massa do baço. H: Massa do coração. I: Massa do tecido adiposo branco. J: Massa do músculo tibial anterior (TA). K: Massa do fígado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal, Log-rank para o surgimento tumoral, ANOVA de um fator e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.62

Figura 16. A: Critérios adotados para a seleção dos microRNAs e resultados encontrados. B: *Heatmap* representando os níveis de expressão dos microRNAs (log2) diferencialmente

expressos selecionados. C: *Volcano plot* apresentando os valores de *fold change* dos microRNAs encontrados no tumor dos animais treinados, registrados em função dos valores de FDR P-val. 64

Figura 17. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. A-B: As 15 vias de sinalização mais enriquecidas no Kegg e Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. C: Componentes celulares enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. D: Funções moleculares enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. E: Os 15 processos biológicos mais enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. 67

Figura 18. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. B: As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*. 68

Figura 19. Análise de *Network Enrichment* envolvendo os microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: microRNAs mais enriquecidos na *network*. B: Genes alvos e preditos dos microRNAs mais enriquecidos na *network*. 69

Figura 20. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos, com homologia com humanos, nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. B: As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. C: Os processos biológicos enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. D: Componentes celulares enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. 71

Figura 21. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. B: As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*. 72

Figura 22. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos, ajustado pelo volume tumoral, nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. B: As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. C: As 20 vias de sinalização mais

enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*. 74

Figura 23. Análise de *Network Enrichment* envolvendo os microRNAs diferencialmente expressos, ajustados pelo volume tumoral, nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: microRNAs mais enriquecidos na *network*. B: Genes alvos e preditos dos microRNAs mais enriquecidos na *network*. 75

Figura 24. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos, ajustado pelo volume tumoral e com homologia com humanos, nos tumores CT26 de camundongos treinados. A: As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. B: As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*. C: Os processos biológicos enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. D: As funções moleculares enriquecidas no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*. 76

Figura 25. Interação entre as análises de microRNA array convencional e ajustada pelo volume tumoral. A: Diagrama de Venn mostrando os microRNAs diferencialmente expressos em comum entre as análises de microRNA array convencional e ajustada pelo volume tumoral. B: Diagrama de Venn mostrando os microRNAs diferencialmente expressos, com homologia para humanos, em comum entre as análises de microRNA array convencional e ajustada pelo volume tumoral. 77

Figura 26: Treinamento físico reduz globalmente a expressão dos microRNAs no tumor CT26. A-D: Análise de RT-qPCR para validação dos microRNAs encontrados diferencialmente expressos no microRNA array em diferentes condições experimentais. Os gráficos de volume tumoral indicam a origem das amostras analisadas. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e ANOVA de um fator. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 79

Figura 27. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta de marcadores de biogênese de microRNAs no tumor CT26. A-J: Análise de RT-qPCR para marcadores relacionados à biogênese de microRNAs nos tumores CT26 em diferentes condições experimentais. Os gráficos de volume tumoral indicam a origem das amostras analisadas. K: Análise de sequenciamento de RNA dos tumores CT26. Dados obtidos de Castle et al., 2014¹³⁴. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e ANOVA de um fator. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 81

Figura 28: Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta de marcadores de desenvolvimento, crescimento e agressividade do câncer colorretal. Análise de RT-qPCR. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA de um fator. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 82

Figura 29: Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta de marcadores de biogênese de microRNAs no tumor CT26 e nas células CT26 primárias. A-C: Análise de RT-qPCR para Dicer, Drosha e Xpo5. As amostras de tumores CT26 de todas as nossas condições experimentais em camundongos Balb/c foram analisadas juntas. D: Análise de RT-qPCR das células tumorais primárias originadas dos tumores c1SED+CT26 e c1TR+CT26 (células c2SED+CT26 e c2TR+CT26). E: Análise de RT-qPCR das células tumorais primárias originadas dos tumores SED+CT26 e TR+CT26 (células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26). F: Análise de RT-qPCR das células tumorais primárias originadas dos tumores tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26 (células tc2SED+CT26 e tc2TR+CT26). Os gráficos de volume tumoral indicam a origem tumoral na qual as células CT26 primárias foram geradas. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 84

Figura 30. Expressão gênica e proteica de marcadores de biogênese de microRNAs em pacientes com câncer de cólon do “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA – genes) e “*Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium*” (CPTAC – proteínas). A-B: Expressão gênica e proteica de DICER1. C-D: Expressão gênica e proteica de XPO5. E-F: Expressão gênica e proteica de DGCR8. G-H: Expressão gênica e proteica de PACT (PRKRA). I-J: Expressão gênica e proteica de AGO2 (EIF2C2). K: Expressão gênica de TRBP (TARBP2). L: Expressão gênica de DROSHA (RNASEN). Resultados gerados através da plataforma UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)¹³⁵. 86

Figura 31: Dicer1 determina sobrevida do paciente com câncer de cólon. A, D e G: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão DICER1 (vermelho) e baixa expressão de DICER1 (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se os seguintes dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>), “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>), e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rma – u133p2” (<http://r2.amc.nl>), respectivamente. B, E e H: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão XPO5 (vermelho) e baixa expressão de XPO5 (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se os seguintes dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>), “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>), e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rma – u133p2” (<http://r2.amc.nl>), respectivamente. C, F e I: Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão DROSHA (vermelho) e baixa expressão de DROSHA (azul). A sobrevida foi

analizada por teste Log Rank utilizando-se os seguintes dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>), “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>), e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rma – u133p2” (<http://r2.amc.nl>), respectivamente. ..88

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ago2 - *Argonaute RISC catalytic subunit 2*

Akt - *AKT serine/threonine kinase 1*

APAF-1 - *Apoptotic protease-activating factor 1*

ARF6 - *ADP ribosylation factor 6*

BAX - *Apoptosis regulator BAX*

BCL-2 – *BCL2 apoptosis regulator*

CCL17 - *C-C motif chemokine 17*

CCL22 - *C-C motif chemokine 22*

Ccnd - *G1/S-specific cyclin-D*

CD206 - *Macrophage mannose receptor 1*

CD31 - *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

CDC42 - *Cell division cycle 42*

CLL23 – *Chronic lymphocytic leukaemia 23*

CONCEA - *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*

Cxcl1 - *C-X-C motif chemokine ligand 1*

Cxcl9 - *C-X-C motif chemokine 9*

Cxcl11 - *C-X-C motif chemokine 11*

DGCR8 - *DGCR8 microprocessor complex subunit*

Dicer - *Endoribonuclease Dicer*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

Drosha - *Drosha ribonuclease III*

Egfr - *Epidermal growth factor receptor*

Eif2 - *Eukaryotic translation initiation factor 2*

ERK - *Mitogen-activated protein kinase 1*

FADD - *Fas associated via death domain*

FAST - *Forkhead box H1*

FDR - *False discovery rate*

Foxm1 - *Forkhead box M1*

Foxp3 - *Forkhead box P3*

GLUT-1 - *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1*

GS - *Glutamine synthetase*

GTP - *Guanosine-5'-triphosphate*

HDAC2 - *Histone deacetylase 2*

Hif1 α - *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*

Ifng - *Interferon gamma*

IL-12 - *Interleukin-12*

IL-1 β - *Interleukin-1 beta*

IL-6 - *Interleukin-6*

Il8rb - *Chemokine (C-X-C motif) receptor 2*

IMC - *Índice de massa corporal*

iNOS - *Nitric oxide synthase, inducible*

KDM1B - *Lysine-specific histone demethylase 1B*

Kegg - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Ki67 - *Proliferation marker protein Ki-67*

LATS2 - *Large tumor suppressor kinase 2*

LLC - *Lewis Lung Carcinoma*

Mcm2 - *Minichromosome maintenance complex component 2*

Mcm3 - *Minichromosome maintenance complex component 3*

Mcm4 - *Minichromosome maintenance complex component 4*

Mcm5 - *Minichromosome maintenance complex component 5*

Mcm6 - *Minichromosome maintenance complex component 6*

MCT-1 - *Modifier of curly tail 1*

MDSCs - *Myeloid-derived suppressor cells*

mRNA – RNA mensageiro

MSI - *Microsatellite instability*

MSO - *Methionine sulfoximine*

MSS - *Microsatellite stable*

MVP - *Major vault protein*

NK - *Natural Killer*

NKG2D - *NKG2-D type II integral membrane protein*

p300 - *Histone acetyltransferase p300*

p53 - *Cellular tumor antigen p53*

PACT - *Protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator*

PD-1 - *Programmed cell death protein 1*

PDC4 - *Pyruvate decarboxylase 4*

PDCD4 - *Programmed cell death*

PDK - *Pyruvate dehydrogenase kinase*

PDK-1 - *[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial*

PDX - *Patient derived xenografts*

PTEN - *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase*

RhoGDI α - *Rho GDP-dissociation inhibitors*

SED+CT26 – *Sedentário CT26*

SLC1A5 - *Neutral amino acid transporter B(0)*

Slc7a5 - *Large neutral amino acids transporter small subunit 1*

Sparc - *Secreted protein acidic and rich in cysteine*

Tnf- α - *Tumor necrosis factor alpha*

Top2a - *DNA topoisomerase II alpha*

TPM1 - *Tropomyosin alpha-1 chain*

TR+CT26 – *Treinado CT26*

TRBP - *TARBP2 subunit of RISC loading complex*

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

Vegf α - *Vascular endothelial growth factor A*

WTX – *Wilms tumor gene*

Xpo5 - *Exportin-5*

YAP - *Transcriptional coactivator YAP1*

YY1 – *Transcriptional repressor protein YY1*

α -SMA - *Alpha-smooth muscle actin*

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Câncer e microRNAs.....	3
2.2 MicroRNAs e câncer de cólon.....	7
2.3 Exercício físico.....	11
2.4 Exercício e câncer.....	12
2.5 Modelos animais.....	13
2.6 Melanoma.....	13
2.7 Câncer de mama.....	15
2.8 Câncer de pulmão.....	22
2.9 Câncer de próstata.....	24
2.10 Câncer de pâncreas.....	25
2.11 Câncer de cólon.....	26
2.12 Câncer, exercício e microRNAs.....	31
2.13 Pacientes.....	32
JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	34
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Treinamento físico aeróbio reduz o crescimento tumoral do câncer de cólon CT26 e aumenta a sobrevida.....	34
4.2 Treinamento físico aeróbio promove alterações persistentes no microambiente tumoral e nas células tumorais.....	39
4.3 Alterações persistentes nas células tumorais induzidas pelo treinamento físico são observadas em camundongos imunocompetentes mas não em camundongos imunodeficientes.....	44
4.4 Treinamento físico reduz a viabilidade celular e formação de colônias das células CT26.....	46
4.5 Treinamento físico reduz o crescimento tumoral CT26 em camundongos imunodeficientes.....	48
4.6 Treinamento físico reduz a metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26.....	50
4.7 Treinamento físico reduz o consumo de exossomos derivados das células CT26 pelas regiões metastáticas.....	56
4.8 Treinamento físico reduz o crescimento tumoral MC38.....	61
4.9 Treinamento físico reduz globalmente a expressão do microRNAs.....	63
4.10 Treinamento físico reduz a expressão gênica de Dicer e Xpo5 nos tumores e nas células CT26 primárias.....	80
4.11 Marcadores de processamento de microRNAs estão alterados em pacientes com câncer de cólon.....	85
4.12 Dicer está associada com a sobrevida do paciente com câncer de cólon em diferentes coorte.....	86
5 DISCUSSÃO.....	89
6 CONCLUSÃO.....	94
7 MÉTODOS.....	95

7.1 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais	95
7.2 Cultura de células tumorais	96
7.3 Transdução da luciferase	96
7.4 Animais e modelo tumoral	96
7.5 Protocolo de treinamento físico aeróbio	97
7.6 Crescimento tumoral	97
7.7 Método de sacrifício e coleta de tecidos	97
7.8 Cultura Primária de células tumorais CT26	97
7.9 Microarray	98
7.10 Ensaio de bioluminescência	98
7.11 Diagrama de Venn	98
7.12 Expressão gênica e de microRNAs	98
7.13 Ensaio de migração celular	100
7.14 Ensaio viabilidade celular	101
7.15 Purificação, caracterização e análise dos exossomos derivados das células CT26	101
7.16 Microscopia eletrônica de transmissão	102
7.17 Biodistribuição dos exossomos derivados das células CT26	102
7.18 miRNet	102
7.19 Análise de sobrevivência dos camundongos	102
7.20 Análise de sobrevivência de pacientes com câncer de cólon	103
7.21 Análise Estatística	103
8 REFERÊNCIAS	103
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A LIBERAÇÃO, CONTEÚDO E ORGANOTROPISMO DOS EXOSSOMOS DERIVADOS DE DIFERENTES EXPLANTES TECIDUAIS	120
RESUMO	121
ABSTRACT	122
1 INTRODUÇÃO	126
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
2.1 Caracterização do Proteoma dos Exossomos Derivados de Explantes Teciduais	134
2.2 Análise do Proteoma Exossomal Identifica Biomarcadores Exossomais Comuns nos Explantes Teciduais Murinos	138
2.3 Caracterização das Moléculas de Adesão Exossomais nos Explantes Teciduais	142
2.4 Identificação de Proteínas Exossomais Exclusivas para Cada um dos Diferentes Explantes Teciduais	144
2.5 Análise do Proteoma Exossomal Derivados De Explantes Teciduais Identifica uma Assinatura Associada ao Exercício	163
2.6 O treinamento físico afeta o organotropismo dos exossomos derivados de explantes teciduais	167
3 CONCLUSÃO	174
4 MÉTODOS	175
4.1 Animais	175
4.2 Protocolo de treinamento físico aeróbio	176
4.3 Purificação, caracterização e análise dos exossomos derivados explantes teciduais	176
4.4 Microscopia eletrônica de transmissão	177
4.5 Análise dependente de dados de amostras de exossomos	177

<i>4.6 Análise de proteômica</i>	<i>178</i>
<i>4.7 Análises computacionais</i>	<i>178</i>
<i>4.8 Biodistribuição dos exossomos derivados de explantes teciduais</i>	<i>179</i>
<i>4.9 Análise estatística</i>	<i>179</i>
5 FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES	180
6 REFERÊNCIAS	222
ANEXOS	225
<i>1 Aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte</i>	<i>225</i>
<i>2 Publicação de artigos em periódicos internacionais e nacionais durante o doutorado</i>	<i>226</i>
<i>3 Publicação de capítulos de livros internacionais e nacionais durante o doutorado</i>	<i>230</i>

1 INTRODUÇÃO

Há décadas o exercício físico é reportado como uma importante ferramenta no combate ao câncer (HOFFMAN et al., 1962; RUSCH; KLINE, 1944), diminuindo, em modelos animais, a incidência de diversos tipos de câncer (NILSSON et al., 2019), atenuando o crescimento tumoral, aumentando a sobrevida, bem como reduzindo metástases. Em humanos, muitos estudos também reportam a capacidade do exercício em diminuir o risco de incidência de diferentes tipos de câncer (MOORE et al., 2016a), bem como sua capacidade de favorecer melhorar tolerância do paciente aos tratamentos do câncer, melhorando, consequentemente, a qualidade de vida do paciente. Muitos estudos com modelos animais têm demonstrado diferentes mecanismos pelos quais o exercício físico parece reduzir o crescimento tumoral. Esses mecanismos estão frequentemente relacionados às alterações na funcionalidade dos vasos tumorais, resposta essa que está associada com melhor entrega e resposta aos tratamentos para o câncer (BETOF et al., 2015), melhora da resposta imune-antitumoral (PEDERSEN et al., 2016; RUNDQVIST et al., 2020) e liberação de substâncias pelo músculo esquelético durante a realização do exercício que poderiam ser consumidos pelo microambiente tumoral, afetando o seu crescimento (AOI et al., 2013).

O câncer de cólon é considerado uma doença do “estilo de vida”, no qual o seu desenvolvimento está associado à maus hábitos alimentares, sedentarismo, sobrepeso, obesidade e consumo excessivo de álcool e tabaco (LIU et al., 2016). Tem sido demonstrado que o exercício físico reduz o crescimento tumoral em diversos modelos animais de câncer de cólon, seja em camundongos transgênicos que desenvolvem câncer de cólon espontaneamente (BALTGALVIS et al., 2009; BASTERFIELD; MATHERS, 2010; COLBERT et al., 2003; JU et al., 2008; MEHL, 2005), em camundongos expostos à carcinógenos que promovem o desenvolvimento do câncer de cólon (DEMARZO et al., 2008; FUKU et al., 2007; KELLY et al., 2017; LUNZ et al., 2008), em modelos PDX (*Patient derived xenografts*) (LU et al., 2018), ou em modelos de injeção de células tumorais de cólon subcutaneamente (FERNANDES et al., 2020; PIGNA et al., 2016). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta são pouco conhecidos.

O câncer de cólon é um dos tipos de câncer que apresenta elevada desregulação de microRNAs (VALERI et al., 2014a). Os microRNAs são uma classe de moléculas que vem sendo largamente estudadas nas últimas duas décadas por apresentarem um papel importante

na regulação proteica, mesmo após a transcrição do RNA mensageiro (mRNA) (AMBROS, 2001; HONG; LEE; AMBROS, 2000; LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; ZHANG; JIANG; LIU, 2017). Os microRNAs são caracterizados como pequenos RNAs de fita curta de aproximadamente ~17-22 nucleotídeos, que não codificam proteínas e atuam ligando-se ao mRNA, reprimindo a tradução de proteínas, além de serem encontrados em diversos organismos como animais e plantas (HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016).

Nos últimos anos, muitos estudos tem demonstrado que o treinamento físico aeróbico apresenta a capacidade de controlar a expressão de diversos microRNAs que estão descompensados por doenças como hipertensão (FERNANDES et al., 2012), infarto do miocárdio (MELO et al., 2014b, 2015b, 2015a), diabetes e obesidade (FERNANDES et al., 2016, 2018b, 2018a; GOMES et al., 2017). Os estudos mostram que essas patologias causam alterações moleculares e estruturais e o treinamento físico aeróbico é um estímulo benéfico para a reversão e controle dessas alterações deletérias como diminuição da massa muscular, rarefação microvascular, hipertensão e remodelamento cardíaco, entre outras. Desta forma, o treinamento físico aeróbico parece regular a expressão de diversos microRNAs envolvidos com essas mudanças maléficas, restaurando o tecido e/ou prevenindo a sua disfunção (FERNANDES et al., 2012, 2016, 2018b, 2018a; GOMES et al., 2017; MELO et al., 2014b, 2015b, 2015a). Esses resultados sugerem que o treinamento físico aeróbico é capaz de regular a expressão de microRNAs em tumores, culminando na atenuação da progressão da doença. Importante salientar que até o momento apenas dois estudos em modelos animais de câncer de mama (ISANEJAD et al., 2016; KHORI et al., 2015) investigaram se a redução do crescimento tumoral seria em decorrências dos efeitos do exercício sobre os microRNAs tumorais descompensados. Além disso, até o momento não há nenhum estudo que tenha verificado se o exercício físico é capaz de promover alterações, especificamente, nas células tumorais, e se essas alterações se mantem ao longo do tempo, mesmo sem o estímulo do exercício físico.

Portanto, entender se o treinamento físico regula a expressão dos microRNAs no microambiente tumoral e nas células tumorais, e se essa regulação se mantem persistente nas células tumorais pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias farmacológicas ou de terapia gênica, com o intuito de mimetizar e/ou maximizar alguns dos efeitos benéficos do treinamento físico, bem como otimizar os tratamentos de primeira escolha do câncer.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer e microRNAs

Nas últimas décadas houve um notório avanço no tratamento dos mais diversos tipos de câncer, melhorando expressivamente o prognóstico dos pacientes (MILLER et al., 2016). No entanto, o câncer ainda continua sendo a segunda principal causa de morte no mundo e, se observados apenas os países desenvolvidos, o câncer é a principal causa de morte (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004; TORRE et al., 2015).

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma de uma célula. Essas mutações proporcionam mudanças no ambiente intracelular que induzem vantagens para a sua proliferação bem como maior resistência aos mecanismos de morte celular. Um aglomerado disfuncional dessas células é classicamente conhecido como tumor. Atualmente, o câncer é entendido como um microambiente, no qual as interações entre os elementos celulares que o compõem são determinantes para a progressão da doença. Exemplos desses elementos seriam a interação das células tumorais com células normais como, por exemplo, fibroblastos, adipócitos, células do sistema imune e células endoteliais (CHAMMAS, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Durante a progressão da doença, as células tumorais desenvolvem uma série de alterações biológicas importantes para sustentar a sua iniciação, proliferação, disseminação e resistência à morte conhecidas como *hallmarks* do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Hanahan e Weinberg (2000, 2011) discutem sobre 10 capacidades biológicas adquiridas pelas células tumorais que podem ser comuns entre as diferentes neoplasias e são importantes para o desenvolvimento e crescimento da massa tumoral, a saber: 1) sinalização de proliferação sustentada, 2) resistência a supressores de crescimento, 3) resistência à apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogênese sustentada, 6) invasão tecidual, 7) instabilidade do genoma celular, 8) inflamação, 9) reprogramação do metabolismo energético e 10) evasão da resposta antitumoral pelo sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Embora Hanahan e Weinberg (2000, 2011) demonstrem possíveis tratamentos para combater cada um dos *hallmarks* do câncer (**Figura 1**), a resposta dos pacientes aos diversos

tratamentos ainda é imprevisível (PUSAPATI et al., 2016; QU et al., 2016), demonstrando a plasticidade das células tumorais (CHOI et al., 2014; LIM et al., 2014; LU et al., 2016; LUO et al., 2016; VAZQUEZ et al., 2013).

Figura 1. Drogas que podem interferir com cada uma das capacidades adquiridas necessárias para o crescimento e progressão tumoral. Adaptado de Hanahan e Weinberg (HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Nesse contexto, há uma série de evidências demonstrando a participação dos microRNAs em diferentes *hallmarks* do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os microRNAs são uma classe de moléculas que vem sendo largamente estudadas nas últimas duas décadas por apresentarem um papel importante na regulação proteica, mesmo após a transcrição do mRNA (AMBROS, 2001; HONG; LEE; AMBROS, 2000; LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; ZHANG; JIANG; LIU, 2017). Os microRNAs são caracterizados como pequenos RNAs de fita curta de aproximadamente ~17-22 nucleotídeos, que não codificam proteínas e atuam ligando-se ao mRNA, reprimindo a tradução de proteínas, além de serem encontrados em diversos organismos como animais e plantas (HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016). Além disso, os microRNAs controlam diversos processos, tanto fisiológicos como patológicos, e há evidências que ao menos um terço de todas as vias biológicas sofrem controle por microRNAs.

A literatura aponta que os microRNAs tem sua expressão alterada nos tumores de diversos tipos de câncer (KODAHN et al., 2014; MÜLLER; NOWAK, 2014; TUTAR, 2014). Por exemplo, Garzon et al. (2010) demonstraram que há uma redução da expressão dos microRNAs-15a/16 nos tumores de pacientes com leucemia linfóide crônica, sendo que esse comportamento também foi observado em células tumorais CLL23 (*Chronic lymphocytic leukaemia 23*). Dessa forma, foi aumentado de maneira ectópica a expressão destes microRNAs nas células tumorais CLL23 para serem investigados os processos de proliferação e apoptose. A superexpressão dos microRNAs 15a/16 nas células tumorais CLL23 promoveu aumento de apoptose e menor proliferação celular. Foi sugerido que esses resultados ocorreram em virtude dos microRNAs 15a/16 alvejarem a proteína BCL-2 (*BCL2 apoptosis regulator*), um importante fator anti-apoptótico. Por fim, a proteína BCL-2 está aumentada em pacientes com a doença (GARZON; MARCUCCI; CROCE, 2010).

Em contraste, os microRNAs também podem estar aumentados nos tumores de diversos tipos de câncer, sendo que seus efeitos biológicos podem aumentar o potencial tumorigênico do tumor. Um exemplo para esse fenômeno é o microRNA-21 que apresenta elevada expressão nos tumores de glioblastomas, câncer de pâncreas, mama e câncer de colón. Em ensaios de perda de função foi observado que o bloqueio do microRNA-21 em células tumorais de glioblastoma aumentou a atividade de caspases, promovendo a apoptose das células tumorais. A explicação para tal resposta é que microRNA-21 alveja as proteínas PTEN (*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase*) e PDCD4 (*Programmed cell death*), funcionando como uma agente anti-apoptótico para as células tumorais (CHAN; KRICHEVSKY; KOSIK, 2005).

Ainda, os microRNAs também podem estar envolvidos na formação de tumores metastáticos. Zhou et al. (2014) demonstraram que o microRNAs-105 presentes nos exossomos liberados pelas células tumorais participam do processo inicial de formação do “nicho pré-metastático” pela destruição da barreira endotelial e aumento da permeabilidade vascular do órgão metastático alvo, favorecendo a difusão dos exossomos tumorais pelo órgão alvo (ZHOU et al., 2014).

Além disso, em condição de hipóxia, células de glioma apresentam um aumento pós transcricional do microRNA-215. Esse aumento pós transcricional do microRNA-215 ocorre pelo aumento da interação HIF1 α (*Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*)/Drosha (*Drosha ribonuclease III*)/pri-microRNA-215 em condição de hipóxia (HU et al., 2016a). Essa maior

interação entre HIF1 α /Drosha/pri-miR-215 promove o aumento do pre-microRNA-215 com consequente aumento do microRNA-215 maduro. O microRNA-215 então irá inibir a tradução de KDMB1 (*Lysine-specific histone demethylase 1B*), promovendo a adaptação das células de glioma e progressão do glioblastoma em condição de hipóxia. Quando o microRNA-215 é inibido nas células de glioma, ocorre uma redução do crescimento tumoral intracranial (HU et al., 2016a).

Embora existam diversos estudos demonstrando o papel específico de diferentes microRNAs sobre a progressão tumoral, nos últimos anos a literatura tem focado em entender como a biogênese/processamento dos microRNAs pode influenciar na progressão tumoral. Por exemplo, células de sarcoma com deleção dos dois alelos de Dicer1 (*Endoribonuclease Dicer 1*) apresentam uma redução global dos microRNAs maduros, maior tempo de doubling, atraso da fase G1 e maiores níveis de apoptose. Quando essas células são injetadas subcutaneamente em animais imunodeficientes ou imunocompetentes, ocorre um maior tempo para o surgimento do tumor, sugerindo que a redução do processamento de microRNAs nas células de sarcoma reduz a progressão tumoral (RAVI et al., 2012).

Já no câncer hepatocelular também é observado uma redução global do microRNAs nas células tumorais. Sun *et al.* (2016) demonstraram que no câncer hepatocelular ocorre o acúmulo de Xpo5 no núcleo da célula tumoral. Entretanto, esse aumento de Xpo5 (*Exportin-5*) não reflete um aumento da biogênese de microRNAs, mas, sim, uma redução global da expressão dos microRNAs em comparação ao tecido saudável. Os autores demonstram que Xpo5 é fosforilada no núcleo, impedindo o transporte dos microRNAs para o citoplasma celular, interrompendo o processo de biogênese do microRNAs (SUN et al., 2016). O mecanismo proposto é que a ativação de ERK (*Mitogen-activated protein kinase 1*) induz a fosforilação de XPO5 que, com isso, não consegue realizar o transporte dos pre-microRNAs do núcleo para o citoplasma. Quando ocorre esse aumento da fosforilação de XPO5 e redução global do microRNAs, ocorre um aumento do crescimento tumoral, sugerindo que para alguns tipos de câncer a redução global dos microRNAs pode impulsionar o crescimento tumoral enquanto que para outros tipos de câncer a redução global dos microRNAs pode atenuar/retardar o crescimento tumoral (SUN et al., 2016).

Embora muitos estudos sugiram que vários tipos de câncer apresentem uma redução global dos microRNAs, como mostrado anteriormente, estudos mais recentes têm demonstrado que ocorre um aumento do transporte de pre-miRNAs e da maquinaria de processamento de

microRNAs para dentro de exossomos. Dentro dos exossomos, os pre-microRNAs serão processados. Esses exossomos podem ser consumidos por células normais, tornando-as capazes de formarem tumores. Células epiteliais normais de mama quando são incubadas com os exossomos de pacientes com câncer de mama adquirem a capacidade de formar tumores. Já quando essas células são incubadas com os exossomos de indivíduos saudáveis, elas não adquirem a capacidade de formar tumores (MELO et al., 2014a).

Além disso, não só nos exossomos ocorre o processamento de microRNAs. Em microvesículas derivadas das células tumorais também ocorre esse processamento. Através de XPO5-Ran-GTP (*Guanosine-5'-triphosphate*) ocorre o transporte dos pre-microRNAs do núcleo para o citoplasma. No citoplasma ARF6 (*ADP ribosylation factor 6*) irá transportar os microRNAs para as microvesículas, as quais serão consumidas por outras células (CLANCY et al., 2019).

2.2 *MicroRNAs e câncer de cólon*

O câncer de cólon é um dos tipos de câncer que apresenta elevada desregulação de microRNAs (VALERI et al., 2014a). É o tipo de câncer com a quarta maior incidência entre homens e mulheres no mundo (**Figura 2**), e o terceiro com maior incidência no Brasil (**Figura 3**). Além disso, o câncer de cólon é um dos 3 tipos de câncer que mais matam no mundo (**Figura 2**), e o quarto que mais mata no Brasil (**Figura 3**). Quando diagnosticado em fases mais avançadas, os pacientes apresentam um pior prognóstico. Muitos estudos sugerem que o câncer de cólon é uma doença do “estilo de vida”, no qual o seu desenvolvimento está associado à maus hábitos alimentares, sedentarismo, sobrepeso, obesidade e consumo excessivo de álcool e tabaco (LIU et al., 2016).

Figura 2. Estimativas no mundo em 2018 para os 15 tipos de câncer com maior mortalidade e incidência e para homens e mulheres. GLOBOCAN 2018 (<https://gco.iarc.fr/>).

Figura 3. Estimativas no Brasil em 2018 para os 15 tipos de câncer com maior mortalidade e incidência para homens e mulheres. GLOBOCAN 2018 (<https://gco.iarc.fr/>).

Mecanicamente, estudos recentes têm demonstrado como os microRNAs afetam a progressão e agressividade do câncer de cólon. Diante disso, nós podemos citar alguns exemplos de microRNAs específicos que estão envolvidos com o desenvolvimento tumoral.

No câncer colorretal, o microRNA-135b é encontrado aumentado tanto em tumores de diferentes modelos animais quanto em tumores de pacientes. Quando os animais são tratados com um anti-miR-135b, o crescimento tumoral é reduzido (VALERI et al., 2014b).

Tang *et. al.* (2019) demonstraram os mecanismos moleculares pelos quais o microRNA-500a afeta a progressão do câncer de cólon. Primeiramente, os autores identificaram que a expressão do microRNA-500a está inibida em diferentes linhagens de células tumorais do câncer de cólon em comparação às células epiteliais de cólon saudáveis. Importante ressaltar que a expressão do microRNA-500a também foi encontrada reduzida em tumores de pacientes com câncer de cólon em comparação ao cólon adjacente saudáveis desses mesmo pacientes. Além disso, quanto menor a expressão do microRNA-500a nos tumores dos pacientes, mais pobremente diferenciados esses tumores se encontravam, com aumento de metástase no linfonodo e consequente redução da sobrevida desses pacientes. Portanto, a expressão do microRNA-500a está reduzida tanto em células tumorais analisadas *in vitro* quanto em tumores de pacientes com câncer de cólon. Quando induzido o aumento ectópico da expressão do microRNA-500a nas células tumorais do câncer de cólon, ocorre uma grande redução do crescimento tumoral em camundongos em comparação às células do câncer de cólon controle. A redução da expressão do microRNA-500a tanto nas células tumorais do câncer de cólon quanto nos tumores de pacientes leva ao aumento da expressão proteica de HDAC2 (*Histone deacetylase 2*). Quando induzido o aumento ectópico de HDAC2 nas células tumorais do câncer de cólon, ocorre um grande aumento do crescimento tumoral em camundongos em comparação às células do câncer de cólon controles. O aumento ectópico da expressão do microRNA-500a reduz os efeitos causados pelo aumento ectópico da expressão de HDAC2 sobre o crescimento tumoral. Além disso, foi observado que a redução da expressão do microRNA-500a nas células tumorais do câncer de cólon ocorre pela ligação da região promotora do microRNA-500a com os sítios de ligação em YY1 (*Transcriptional repressor protein YY1*), a qual apresenta 3 sítios de ligação para a região promotora do microRNA-500a. Como YY1 interage com HDAC2, sua expressão também está aumentada nas células tumorais do câncer de cólon e nos tumores de pacientes. Esse aumento da expressão de YY1 promove a redução da expressão do microRNA-500a pela ligação de sua região promotora aos sítios de ligação em YY1. Por fim, a interação de p300 (*Histone acetyltransferase p300*) com YY1 e HDAC2 acarreta a redução de sua expressão proteica nas células tumorais do câncer de cólon e nos tumores de pacientes. Quando é induzido o aumento ectópico da expressão de p300, ocorre a inibição dos efeitos causados

pelo aumento da expressão de HDAC2 e YY1, bem como o aumento da expressão do microRNA-500a, uma vez que p300 inibe a interação do promotor do microRNA-500a com seus sítios de ligação em YY1 (TANG et al., 2019).

Zhu *et. al.* (2019) (ZHU et al., 2019) estudaram a relação entre WTX (*Wilms tumor gene*) e os microRNAs para a progressão do câncer de cólon. Os autores observaram que WTX está reduzido em tumores de cólon de pacientes em comparação ao cólon adjacente saudável. Além disso, pacientes com baixa expressão de WTX nos tumores apresentaram uma menor sobrevida em comparação aos tumores dos pacientes que apresentavam alta expressão de WTX. Quando realizado a superexpressão de WTX nas células tumorais do câncer de cólon humano SW480 e SW620, foi observado uma redução do crescimento tumoral e metástase em comparação aos camundongos injetados com as células controle (ZHU et al., 2019), enquanto que o nocaute de WTX promoveu efeitos inversos à superexpressão. Importante ressaltar que esses resultados foram observados quando as células foram injetadas subcutaneamente e ortotopicamente. Como apenas 1-10% dos tumores de cólon apresentam perda de WTX, os autores investigaram se os microRNAs afetariam essa perda de WTX. Após análise de microRNA array comparando-se o aqueles tumores com perda WTX com o cólon adjacente saudável, foram encontras 20 microRNA aumentados e 10 microRNAs diminuídos nos tumores. Dos 20 microRNAs aumentados, os microRNAs-20a e -106a foram confirmados com alvos de WTX nas células SW480 e HCT116 (ZHU et al., 2019). Além disso as células tumorais do câncer de cólon que apresentavam níveis mais elevados de expressão dos microRNAs-20a e -106a foram aquelas que apresentam menores níveis de expressão proteica de WTX (ZHU et al., 2019), e que a inibição desses microRNAs resulta no aumento da expressão proteica de WTX (ZHU et al., 2019). Além disso, a inibição dos microRNAs-20a e -106a nas células tumorais HCT116 e SW480 promoveu redução do crescimento tumoral e metástase quando as células foram injetadas subcutaneamente e ortotopicamente (ZHU et al., 2019). O mecanismo demonstrado pelo qual os microRNAs-20a e -106a afetam a expressão de WTX é pela desestabilização do complexo WTX/RhoGDI α (*Rho GDP-dissociation inhibitors*)/CDC42 (*Cell division cycle 42*), no qual esses microRNAs diminuirão a ligação de CDC42 com RhoGDI α pelo aumento da atividade de CDC42 (ZHU et al., 2019), fenômeno esse que impede a formação do complexo WTX/RhoGDI α /CDC42 (ZHU et al., 2019).

Teng *et al.* (2017) buscaram entender a relação entre os microRNAs exossomais derivados dos tumores CT26 e o crescimento tumoral e metástase (TENG et al., 2017).

Primeiramente, foram identificados os microRNAs exossomais diferencialmente expressos entre o cólon saudável, o tumor CT26 crescido no cólon e o tumor CT26 crescido no fígado via injeção intra-esplênica para mimetizar a metástase no fígado (TENG et al., 2017). Foi identificado que os microRNAs considerados oncogênicos estavam mais expressos no tecido tumoral do que nos exossomos tumorais, ao passo que os microRNAs considerados supressores tumorais estavam mais expressos nos exossomos tumorais do que no tecido tumoral (TENG et al., 2017). Além disso, o microRNA-193a, um microRNA considerado supressor tumoral, estava aumentado nos exossomos dos tumores CT26 formados no cólon e no fígado, bem como nos exossomos circulantes e fecais em comparação aos exossomos de camundongos saudáveis (TENG et al., 2017). Importante ressaltar que o padrão de expressão dos microRNAs exossomais foi semelhante nos tumores CT26 injetados ortotopicamente no cólon ou subcutaneamente (TENG et al., 2017). Mecanicamente, os autores identificaram que as células tumorais CT26 aumentam o carregamento do microRNA-193a para os exossomos via proteína MVP (*Major vault protein*) para que as células tumorais possam sustentar a sua proliferação, progressão e metástase (TENG et al., 2017).

Portanto, todos esses resultados demonstram o papel dos microRNAs sobre o desenvolvimento e agressividade do câncer de cólon, sendo que estratégias capazes de subverter o impacto dos microRNAs sobre os processos de tumorigênese do câncer de cólon são de fundamental importância para a redução da incidência e mortalidade provocada pela doença.

2.3 Exercício físico

Diante disso, sabe-se que o exercício físico regular resulta em uma série de adaptações benéficas ao organismo, tendo como resposta fundamental a melhora da aptidão física (EGAN; ZIERATH, 2013). Entende-se por aptidão física, a capacidade de realizar tarefas diárias com vigor e estado de alerta, sem fadiga indevida e com energia para desfrutar de atividades de lazer e para atender emergências imprevistas (WORLD HEALTH ORGANIZATION PHYSICAL ACTIVITY, 2017). A atividade física é um termo amplo que engloba tanto atividades estruturadas (treinamento físico: exercício físico com volume, intensidade e duração controlados) como não estruturadas (atividades recreacionais) (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

São diversas as evidências que sustentam a importância da manutenção de uma vida fisicamente ativa para a saúde. Indivíduos saudáveis e/ou cardiopatas que apresentam baixa capacidade física tendem a apresentar uma menor sobrevida em comparação com aqueles que apresentam alta capacidade física (KOKKINOS et al., 2008). Corroborando com esses dados clínicos e epidemiológicos, já é bem estabelecido na literatura que ratos com alta capacidade aeróbia intrínseca (*high capacity runners* - HCR) apresentam uma maior sobrevida (~45%) quando comparados a ratos com baixa capacidade aeróbia (*low capacity runners* - LCR) (KOCH et al., 2011; WISLØFF et al., 2005). Além disso, existe uma série de evidências que demonstram os benefícios da prática regular de exercício físico para a prevenção e tratamento de doenças crônicas (BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012; FIUZA-LUCES et al., 2013; FLACHENECKER, 2012; HILLMAN; ERICKSON; KRAMER, 2008; PAHOR et al., 2014), incluindo o câncer (FRIEDENREICH; CUST, 2008; KNOLS et al., 2005; MOORE et al., 2016b; NEILSON et al., 2009; SCHMITZ et al., 2005; VOGEL, 2000).

2.4 Exercício e câncer

No contexto do câncer, a literatura demonstra os diversos benefícios do exercício físico aeróbio para a diminuição do risco de incidência de diversos tipos de câncer (MOORE et al., 2016b). Moore *et al.* (2016) demonstraram que a prática regular de atividade física resultou na redução da incidência de 13 tipos de câncer em 26 analisados em 1,44 milhões de adultos (MOORE et al., 2016b). De nota, aqueles indivíduos que realizaram maiores volumes diários de atividade física apresentaram redução na incidência dos seguintes cânceres: adenocarcinoma de esôfago, câncer de fígado, câncer de pulmão, câncer de rim, câncer de cárdia gástrica, câncer endometrial, leucemia mielóide, mieloma, câncer de cólon, câncer de cabeça e pescoço, câncer de reto, câncer de bexiga e câncer de mama (MOORE et al., 2016b). Importante ressaltar que os efeitos do exercício físico para a redução da incidência do câncer foi independente de outros fatores como, por exemplo, índice de massa corporal (IMC), fumo, região geográfica, uso de terapia hormonal e etnia (MOORE et al., 2016b). Além disso, achados clínicos indicam que pacientes com câncer que possuem uma capacidade física reduzida, apresentam um pior prognóstico (CRAMER et al., 2014; JONES et al., 2012; KOELWYN; JONES; MOSLEHI, 2014). Por exemplo, indivíduos com câncer de cólon apresentam uma redução superior a 20% no consumo máximo de oxigênio (VO₂ máx.) quando comparados aos seus pares saudáveis

(CRAMER et al., 2014). Lakoski *et al.* (2015) demonstram que pacientes com câncer de pulmão e câncer de cólon com maior capacidade física apresentam uma maior sobrevida em comparação aos pacientes com menor capacidade física (LAKOSKI et al., 2015). Por fim, é importante saliente que a prática regular de exercício físico é proposto como um fator protetor contra o desenvolvimento do câncer de cólon (LIU et al., 2016).

2.5 Modelos animais

A literatura também demonstra que o exercício físico aeróbio é capaz de atenuar o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em animais (BETOF et al., 2015; GOH et al., 2013; HIGGINS et al., 2014; HOJMAN et al., 2014; JU et al., 2008; MICHNA et al., 2006; ROEBUCK; MCCAFFREY; BAUMGARTNER, 1990; WOLFF et al., 2014). Embora alguns mecanismos moleculares sejam demonstrados, existem uma série de limitações que dificultam a reprodutibilidade dos mecanismos propostos. A seguir, nós discutiremos, criticamente, os trabalhos recentes em modelos animais que buscaram identificar as alterações moleculares induzidas pelo exercício no microambiente tumoral em diferentes tipos de câncer, bem como do câncer de cólon.

2.6 Melanoma

Recentemente, Pedersen *et al.* (2016) demonstraram que o exercício físico reduziu o crescimento tumoral do melanoma B16F10 em camundongos jovens e idosos, bem como diminuiu a formação de nódulos metastáticos (PEDERSEN et al., 2016). O exercício realizado em roda de atividade física aeróbia voluntárias reduziu o crescimento tumoral quando realizado apenas previamente a injeção das células tumorais, e quando realizado previamente e mantido após a injeção das células tumorais. Além disso, o exercício também reduziu a formação de nódulos metastáticos no pulmão, principal região metastática das células B16F10, quando as células foram injetadas via veia caudal. Entretanto, quando o exercício foi realizado apenas após a injeção das células tumorais, o crescimento tumoral não foi alterado em comparação aos camundongos sedentários. Os autores demonstraram que o exercício aumentou a mobilização e redistribuição das células NK (*Natural Killer*) para o microambiente tumoral. Os mecanismos envolvidos nessas respostas estariam relacionados ao aumento de IL-6 e epinefrina circulantes

induzidos durante o exercício. Com isso, ocorreria a mobilização e redistribuição das células $NK^{+}IL-6^{+}$ do baço para a circulação e, posteriormente, da circulação para o microambiente tumoral. Esse aumento de células NK no microambiente tumoral foi proposto como o principal mecanismo induzido pelo exercício para a atenuação do crescimento tumoral. Entretanto, várias considerações podem ser feitas acerca dos mecanismos envolvidos na redução do crescimento tumoral B16 induzido pelo exercício. Os autores observaram que o exercício reduziu o crescimento tumoral quando realizado apenas previamente, sendo interrompido após a injeção das células tumorais. Esses resultados sugerem que aumento de IL-6 (*Interleukin-6*) e epinefrina circulantes induzidos durante o exercício não são os únicos responsáveis pela redução do crescimento tumoral, uma vez que os camundongos permaneceram inativos após a injeção das células tumorais, não havendo os aumentos circulantes de IL-6 e epinefrina durante o crescimento tumoral. Além disso, foi observado por citometria de fluxo que o exercício aumentou a porcentagem de células T $CD3^{+}$ e das células dendríticas $CD11b^{+}GR-1^{-}CD11c^{+}$, e, por citometria de fluxo e imuno-histoquímica, que o exercício também aumentou a porcentagem de células T $CD4^{+}$ e células T $CD8^{+}$, o que pode indicar a participação dessas células na redução do crescimento tumoral induzida pelo exercício em camundongos imunocompetentes, mesmo que tenha sido observado que o exercício reduziu o crescimento tumoral em camundongos imunodeficientes NMRI-Foxn1nu, os quais apresentam deficiência na função das células T; e que o exercício não alterou o crescimento tumoral em camundongos imunocompetentes tratados com anti-asialo-GM1, o qual depleta células NK. Importante ressaltar que a depleção das células NK fez com que o tumor dobrasse de tamanho, fato esse que poderia mascarar os efeitos do exercício sobre uma possível redução do crescimento tumoral influenciada pelas células T.

Buss *et al.* (2020) também não observaram alteração no crescimento tumoral B16F10 e sobrevida quando o exercício foi realizado em roda de atividade física aeróbia voluntária apenas após a injeção das células tumorais. Além disso, o exercício não alterou a proliferação celular (imuno-histoquímica para pHH3), as regiões de hipóxia tumoral (imunofluorescência para pimonidazole) e a densidade vascular (imuno-histoquímica para CD31 - *Platelet endothelial cell adhesion molecule*) (BUSS et al., 2020).

Contudo, Schadler *et al.* (2016) observaram um aumento do crescimento tumoral B16F10 quando o exercício foi realizado em esteira e iniciado após os tumores atingirem $\sim 35mm^3$. Além disso, o exercício aumentou comprimento dos vasos tumorais

(imunofluorescência para CD31), sem alterar a cobertura pericítica desses vasos tumorais (imunofluorescência para CD31 e α -SMA - *Alpha-smooth muscle actin*) em comparação aos camundongos controle. Entretanto, quando o exercício foi associado com o tratamento com doxorrubicina, houve uma redução do crescimento tumoral em comparação aos camundongos controle e aos camundongos tratados apenas com doxorrubicina, o qual por si só não alterou o crescimento tumoral em comparação aos camundongos controle. Importante ressaltar que a entrega da doxorrubicina ao tumor foi aumentada imediatamente após a realização de uma sessão de exercício, enquanto que não foi observada nenhuma alteração 72 horas após o término da sessão de exercício. Embora tenha sido observado que o exercício aumentou o comprimento dos vasos tumorais, não é possível afirmar que a redução do crescimento tumoral B16F10 induzida pela combinação exercício e doxorrubicina estava associada com o remodelamento dos vasos tumorais, uma vez que em nenhum momento foi realizada as análises dos vasos tumorais comparando-se os tumores do camundongos controles (sedentários e exercício - sem tratamento com doxorrubicina) com os tumores dos camundongos tratados com doxorrubicina (sedentários e exercício) (SCHADLER et al., 2016).

2.7 Câncer de mama

Os efeitos do exercício sobre o câncer de mama são amplamente estudados e provavelmente seja um dos tipos de câncer que fornece mais informações, na literatura, sobre as alterações que o exercício promove no microambiente tumoral. Vulczak *et al.* (2020) avaliaram os efeitos do exercício aeróbio sobre o metabolismo tumoral do câncer de mama murino 4T1 (VULCZAK et al., 2020). O exercício reduziu o crescimento tumoral em camundongos que realizaram 8 semanas de exercício físico aeróbio em esteira antes da injeção das células tumorais e por mais 4 semanas de exercício após a injeção das células tumorais 4T1. Além disso, o exercício também reduziu o crescimento tumoral quando realizado apenas após a injeção das células tumorais. Entretanto, os camundongos que realizaram exercício apenas antes da injeção das células tumorais, permanecendo sedentários após a injeção das células tumorais, não apresentaram alteração do crescimento tumoral em comparação aos camundongos sedentários (VULCZAK et al., 2020), sugerindo que a redução do crescimento tumoral 4T1 pode ter sido induzida pelos efeitos do exercício durante o crescimento tumoral e não por adaptações crônicas do organismo ao exercício. Contudo, Wang *et al.* (2020), utilizando

um desenho experimental muito semelhante ao estudo de Vulczak *et al.* (2020), constataram que o exercício realizado em esteira apenas antes da injeção das células tumorais 4T1 foi eficiente em reduzir o crescimento tumoral (WANG *et al.*, 2020). Através de análise de calorimetria indireta, Vulczak *et al.* (2020) observaram que o tumor 4T1 induziu a redução da razão de troca respiratória de ~ 1 para $\sim 0,9$ após 4 semanas da injeção das células tumorais nos camundongos sedentários, sugerindo a utilização de lipídeos e carboidratos como substratos energéticos, enquanto que o exercício realizado apenas antes da injeção das células tumorais não impediu essa queda. Entretanto, o exercício realizado pré e pós a injeção das células tumorais, bem como o exercício realizado apenas após a injeção das células tumorais impediram essa queda, mantendo os valores de troca respiratória em torno de ~ 1 (VULCZAK *et al.*, 2020). Quando foi avaliada a capacidade respiratória mitocondrial dos tumores 4T1 dos camundongos sedentários e que realizaram o exercício pré e pós a injeção das células tumorais, o exercício induziu uma menor taxa respiratória mitocondrial em todos os estados respiratórios, com uma redução significativa no estado de capacidade máxima de transporte de elétrons. O exercício também promoveu uma capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial próxima ao seu limite respiratório máximo quando comparada ao tumor dos camundongos sedentários. Além disso, o exercício induziu o aumento da expressão gênica de MCT-1 (*Modifier of curly tail 1*), PDK (*Pyruvate dehydrogenase kinase*), HIF1 α , P53 (*Cellular tumor antigen p53*) e LATS2 (*Large tumor suppressor kinase 2*), e não alterou a atividade de citrato sintase e a concentração de lactato (VULCZAK *et al.*, 2020).

Além de demonstrarem que o exercício realizado em esteira apenas previamente à injeção das células tumorais 4T1 reduziu o crescimento tumoral, Wang *et al.* (2020) demonstraram por imuno-histoquímica que o exercício aumentou a quantidade de células NK no tumor e no baço, bem como aumentou a expressão proteica de marcadores associados à apoptose como FAST (*Forkhead box H1*), FADD (*Fas associated via death domain*), BAX (*Apoptosis regulator BAX*), Citocromo C, Caspase clivada 3 e 9 e APAF-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) (WANG *et al.*, 2020). Curiosamente, o exercício promoveu um aumento basal nas concentrações circulantes de epinefrina e IL-6 após 22 dias da última sessão de exercício (WANG *et al.*, 2020), resultados que divergem dos encontrados na literatura, os quais demonstram que epinefrina e IL-6 aumentam durante e imediatamente após a sessão de exercício, e que seus valores retornam aos níveis basais após 24-48 horas da sessão de exercício (DETHLEFSEN *et al.*, 2017; PEDERSEN *et al.*, 2020).

Wennerberg *et al.* (2020) demonstraram que o exercício realizado em esteira, e iniciado 8 dias após a injeção das células tumorais 4T1, reduziu o crescimento tumoral e a esplenomegalia induzida pelo tumor 4T1. Esses resultados foram acompanhados de uma redução das células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs - *Myeloid-derived suppressor cells*) granulocíticas (só quando normalizado por grama de baço) e monocíticas (encontrado quando normalizado por grama de baço e por % de esplenócitos) no baço, não havendo alterações na porcentagem de células T CD3⁺, células T CD8⁺ e células NK. Embora não tenha sido observada alteração na porcentagem de células NK, o exercício aumentou a proliferação (células NK CD3⁻ NKp46⁺ Ki67⁺) e a ativação (células NK CD3⁻ NKp46⁺ CD69⁺) das células NK no baço. Além disso, o exercício também reduziu, no tumor, as MDSCs totais e aumentou a ativação das células T CD8⁺ CD69⁺, não havendo alteração na porcentagem de células T CD8⁺, CD4⁺ e da proliferação das células T CD8⁺ Ki67⁺. De nota, o exercício aumentou a ativação das células T CD8⁺ tanto no tumor quanto no baço (WENNERBERG *et al.*, 2020).

Seguindo a mesma linha, Turbitt *et al.* (2020) também estudaram os efeitos do exercício sobre crescimento tumoral e a produção das MDSCs pelo baço em animais com o tumor 4T1. Diferentemente do estudo de Wennerberg *et al.* (2020), Turbitt *et al.* (2020) utilizaram a roda de atividade física aeróbia voluntária durante 8 semanas antes da injeção das células tumorais, continuando o exercício até o tumor atingir 0.05–0.20 cm³ (~26 dias após a injeção das células tumorais) ou 35 dias após a injeção das células tumorais, momentos nos quais os camundongos foram sacrificados. Embora o exercício não tenha alterado o crescimento tumoral no grupo de camundongos sacrificados após 35 dias da injeção das células tumorais, o exercício retardou o tempo para que o tumor atingisse 0.05–0.20 cm³. Em relação à esplenomegalia, o exercício não alterou, no baço, a contagem de esplenócitos, porcentagem das MDSCs totais, MDSCs granulocíticas, MDSCs monocíticas, células B CD19⁺, células T totais CD3⁺, células T auxiliares CD3⁺ CD4⁺, células T CD8⁺, células NK1.1⁺, células dendríticas I-Ad⁺ CD11c⁺, macrófagos I-Ad⁺ CD11b⁺ e macrófagos F4/80⁺ dos camundongos sacrificados com tumores entre 0.05–0.20 cm³ e em camundongos sacrificados após 35 dias da injeção das células tumorais. Além disso, o exercício também não alterou, no tumor, a porcentagem de células T CD8⁺, células T CD4⁺, e a porcentagem das MDSCs totais, MDSCs granulocíticas e MDSCs monocíticas dos camundongos sacrificados com tumores entre 0.05–0.20 cm³ e em camundongos sacrificados após 35 dias da injeção das células tumorais (TURBITT *et al.*, 2019). Curiosamente, quando realizado PCR Array para “*Cancer Inflammation & Immunity*

Crosstalk”, a resposta gênica ao exercício foi diferente entre os tumores com 0.05–0.20 cm³ e os tumores coletados após 35 dias da injeção das células tumorais. Por exemplo, o exercício induziu a diminuição da expressão gênica de Cxcl1 (*C-X-C motif chemokine ligand 1*), Egfr (*Epidermal growth factor receptor*), Cxcl9 (*C-X-C motif chemokine 9*), Ccl22 (*C-C motif chemokine 22*), Foxp3 (*Forkhead box P3*) e Ifng (*Interferon gamma*) nos tumores com 0.05–0.20 cm³, enquanto que o exercício induziu o aumento desses genes nos tumores dos camundongos sacrificados 35 dias após a injeção das células tumorais, sendo que dos dados demonstrados pelos autores, apenas Cxcl11 (*C-X-C motif chemokine 9*) estava aumentado em ambas as condições experimentais.

Betof *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do exercício sobre a vascularização tumoral do câncer de mama 4T1 (BETOF *et al.*, 2015). Embora os autores demonstrem que o exercício realizado em roda atividade física aeróbica tenha reduzido o crescimento tumoral e as regiões de hipóxia no microambiente tumoral, bem como aumentado a apoptose tumoral (imunofluorescência para caspase 3 clivada), a densidade microvascular (imunofluorescência para CD31), a cobertura pericítica sobre as células endoteliais tumorais (imunofluorescência para CD31 e Desmina) e a expressão gênica de VEGF α (*Vascular endothelial growth factor A*), esses resultados só foram encontrados quando os autores combinaram os seguintes grupos experimentais:

- Grupo considerado sedentário: combinação de camundongos sedentários durante todo o protocolo experimental com camundongos que realizaram 9 semanas de exercício apenas antes da injeção das células tumorais.

- Grupo considerado exercitado: combinação de camundongos que realizaram exercício pré e pós injeção das células tumorais com camundongos que realizaram exercício apenas após a injeção das células tumorais (BETOF *et al.*, 2015).

Uma vez que o grupo sedentário também apresentava camundongos que realizaram 9 semanas de exercício apenas antes da injeção das células tumorais, os resultados encontrados poderiam estar associados aos efeitos do exercício após a injeção das células tumorais e durante o crescimento tumoral, e não relacionados às adaptações do organismo ao exercício realizado previamente à injeção das células tumorais. Por fim, o exercício também reduziu o crescimento tumoral do câncer de mama EO771 e aumentou a densidade microvascular tumoral (imunofluorescência para CD31).

Pedersen *et al.* (2020) avaliaram se a redução dos níveis circulantes de glutamina durante uma sessão de exercício poderia reduzir o crescimento tumoral em decorrência de um menor aporte de glutamina para o tumor de mama EO771. O exercício realizado em roda de atividade física aeróbia voluntária durante 4 semanas antes da injeção das células tumorais e por mais 15 dias após a injeção das células tumorais foi eficiente em reduzir o crescimento tumoral EO771. Nesse grupo de camundongos, o exercício não alterou os níveis circulantes de glutamina após 15 dias da injeção das células tumorais. Como os autores não deixaram claro o momento específico sobre o qual o sangue desses camundongos foi coletado para as análises dos níveis de glutamina, não é possível determinar se o protocolo de exercício em roda de atividade promove algum tipo de alteração nos níveis circulantes de glutamina. Diante disso, também não é possível afirmar que a redução do crescimento tumoral EO771 induzida pelo exercício foi em decorrência da redução dos níveis circulantes de glutamina. Além disso, as adaptações crônicas ao exercício antes da injeção das células tumorais também poderiam ser um dos fatores responsáveis pela redução do crescimento tumoral EO771.

Em outro grupo de camundongos que realizaram o mesmo protocolo experimental descrito acima, porém com a introdução de uma sessão aguda de exercício em piscina após 16 dias da injeção das células tumorais para a análise dos níveis sanguíneos de glutamina antes, imediatamente após, 2, 24 e 48 horas após a sessão de exercício em piscina, foi observado que a sessão aguda de exercício em piscina reduziu os níveis circulantes de glutamina por até duas horas, retornando ao seu nível basal após 24 horas da sessão aguda de exercício em piscina. Além disso, nos tumores destes camundongos, após duas horas da sessão aguda de exercício houve um aumento da expressão gênica de glutamina sintetase e de Slc7a5 (*Large neutral amino acids transporter small subunit 1*) (marcador de transporte de glutamina para a células), sendo que após 24 horas a expressão desses genes voltaram aos seus níveis basais. Por fim, camundongos com os tumores EO771 tratados com um inibidor de glutamina sintetase (MSO - *methionine sulfoximine*) não apresentaram alteração na massa e volume tumoral em comparação aos camundongos que não foram tratados com MSO, mesmo tendo sido observada uma grande redução dos níveis circulantes de glutamina nesses mesmos camundongos, sugerindo que o crescimento dos tumores EO771 não seja afetado pela ausência de glutamina no organismo, embora tenha sido observada uma menor proliferação celular, *in vitro*, das células EO771 quando essas foram crescidas na ausência de glutamina (PEDERSEN *et al.*, 2020).

Glass *et al.* (2017) investigaram se tumores de mama que apresentam o mesmo subtipo molecular (claudin-low) exibiriam diferentes respostas ao exercício. Utilizando as células tumorais do câncer de mama EO771, 4T07 e C3(1)SV40, o exercício realizado em esteira e iniciado após a injeção das células tumorais reduziu o crescimento do tumor EO771, não alterou o crescimento do tumor 4T07 e aumentou o crescimento do tumor C3(1)SV40. A redução do crescimento tumoral EO771 induzida pelo exercício foi acompanhada, no tumor, de uma redução da proliferação celular (imuno-histoquímica para Ki67 - *Proliferation marker protein Ki-67*) e redução da expressão proteica de HIF1 α , não havendo alteração da expressão proteica de PDK-1 (*[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial*) e GLUT-1 (*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1*). Já o aumento do crescimento tumoral C3(1)SV40 induzido pelo exercício foi acompanhado, no tumor, de um aumento da proliferação celular, aumento da expressão proteica de HIF1 α , PDK-1 e GLUT-1. Em ambos os modelos de câncer de mama, o exercício não alterou a porcentagem de células apoptóticas (imuno-histoquímica para TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) e a expressão gênica de HIF1 α . Por fim, quando realizada metabolômica dos tumores EO771 e C3(1)SV40, o exercício alterou significativamente 8 metabólitos no tumor EO771, enquanto que para o tumor C3(1)SV40 o exercício alterou significativamente 24 metabólitos. Infelizmente, os autores não demonstraram quais foram os metabólitos alterados pelo exercício nos tumores EO771 e C3(1)SV40. Além disso, os tumores EO771 e C3(1)SV40 não foram comparados entre si para verificar quais as diferenças existentes entre eles que poderiam estar influenciando na resposta ao exercício. Ademais, para cada um dos modelos tumorais utilizado, foram utilizados camundongos imunocompetentes de diferentes linhagens. Assim, para as células EO771 foram utilizados animais C57/Bl6, para as células 4T07 foram utilizados animais BALB/c e para as células C3(1)SV40 foram utilizados camundongos FVB/NJ. Diante disso, a resposta ao exercício também pode ser em decorrência da linhagem dos camundongos, uma vez que esses animais, por exemplo, apresentam características imunológicas diferentes (GLASS *et al.*, 2017).

Contrariando os resultados encontrados por Glass *et al.* (2017) (GLASS *et al.*, 2017), Buss *et al.* (2020) observaram que o exercício realizado em roda de atividade física aeróbia voluntário após a injeção das células tumorais EO771 não alterou o crescimento tumoral, a sobrevida, a proliferação celular tumoral (imuno-histoquímica para pHH3), as regiões de

hipóxia tumoral (imunofluorescência para pimonidazole) e a densidade vascular (imuno-histoquímica para CD31) (BUSS et al., 2020).

Utilizando as células tumorais do câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231, Dethlefsen *et al.* (2017) avaliaram os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na redução do crescimento tumoral induzido pelos fatores circulantes alterados durante o exercício aeróbio (DETHLEFSEN et al., 2017). Quando as células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram incubadas por 48 horas com o soro coletado imediatamente antes, durante e imediatamente após uma sessão exercício em pacientes com câncer de mama que participaram de um protocolo de exercício aeróbio de 6 semanas, o soro coletado imediatamente após a sessão de exercício reduziu a viabilidade celular de ambas as linhagens celulares testadas (DETHLEFSEN et al., 2017). Um ponto para ser considerado é que não houve um grupo controle no qual o soro fetal bovino não tenha sido trocado totalmente pelo soro das pacientes para verificar se a troca dos 10% do soro fetal bovino pelos 10% do soro das pacientes não afetaria por si só a viabilidade das células tumorais. Quando as células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas do com soro das pacientes em repouso ou imediatamente após o exercício foram injetadas em animais imunodeficientes NMRI-Foxn1^{nu}, foi observado que o tratamento com soro coletado imediatamente após a sessão de exercício reduziu o crescimento tumoral MCF-7, enquanto que não foi observado nenhuma diferença para os tumores MDA-MB-231 (DETHLEFSEN et al., 2017). Uma vez que a sessão de exercício aumentou as concentrações circulantes de epinefrina e noradrelina, foi avaliado se esses fatores alterados pelo exercício estariam promovendo a redução do crescimento tumoral das células MCF-7. O tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-231 com epinefrina ou noradrelina reduziu, *in vitro*, a viabilidade celular e, *in vivo*, o crescimento tumoral em ambas as linhagens de células tumorais. Embora o tratamento das células tumorais MCF-7 com a combinação propranolol, um bloqueador da sinalização β -adrenérgica, mais o soro coletado imediatamente após a realização do exercício tenha inibido a redução da viabilidade celular, o tratamento *per se* com propranolol também reduziu a viabilidade das células tumorais em comparação as células tumorais não tratadas com propranolol, o que poderia indicar que a dose utilizada de propranolol *per se* pode ter sido tóxico para as células. Além disso, o exercício realizado por camundongos imunodeficientes NMRI-Foxn1^{nu} em roda de atividade física aeróbia voluntária, iniciado após a injeção das células tumorais, reduziu o crescimento tumoral MCF-7 e MDA-MB-231. Os autores propuseram que o mecanismo envolvido na redução do crescimento tumoral induzida pelo

exercício estaria relacionado ao aumento das concentrações circulantes de epinefrina e noradrenalina durante o exercício, e que essas alterações promoveriam um aumento da ativação da via de sinalização supressora tumoral Hippo. Entretanto, quando as células tumorais foram tratadas com o soro coletado imediatamente após o exercício, foi observado apenas um ligeiro aumento na expressão proteica de YAP e YAP fosforilada, além de não ter sido observado nenhuma alteração em outros marcadores relacionados à via de sinalização de Hippo. Além disso, o exercício não alterou a expressão proteica de YAP (*Transcriptional coactivator YAP1*) e YAP fosforilada nos tumores dos camundongos imunodeficientes NMRI-Foxn1^{nu}, embora as análises tenham sido realizadas com os camundongos em repouso, fato esse que poderia explicar os resultados encontrados. Ademais, não foi avaliado se o modelo de exercício utilizado, roda de atividade física, aumenta as concentrações circulantes de epinefrina e noradrenalina durante a sessão de exercício em camundongos imunodeficientes NMRI-Foxn1^{nu}. Embora o tratamento com epinefrina e noradrenalina tenha reduzido o crescimento tumoral, em nenhum momento é mostrado a expressão proteica de marcadores relacionados a via de sinalização de Hippo. Importante ressaltar que o exercício reduziu o crescimento tumoral MCF-7 e MDA-MB-231 independentemente do sistema imune adaptativo, uma vez que foram usados camundongos imunodeficientes NMRI-Foxn1^{nu} (DETHLEFSEN et al., 2017).

2.8 Câncer de pulmão

Pedersen *et al.* (2020) também avaliaram se a redução dos níveis circulantes de glutamina induzidos durante uma sessão de exercício poderia reduzir o crescimento tumoral em decorrência de um menor aporte de glutamina para o tumor de pulmão LLC (*Lewis Lung Carcinoma*). Utilizando o mesmo protocolo de exercício citado anteriormente, o exercício reduziu o crescimento tumoral LLC. Importante salientar que o tumor LLC foi responsivo ao tratamento com o inibidor de glutamina sintetase (MSO), ou seja, os camundongos tratados com MSO apresentaram uma redução da massa e do volume tumoral em comparação aos camundongos controle, sugerindo que as células tumorais LLC são mais sensíveis à disponibilidade de glutamina para o crescimento da massa tumoral. Quando realizado um sequenciamento de RNA dos tumores LLC desses camundongos, não foi encontrado nenhum gene diferencialmente expresso entre os grupos experimentais, bem como, por RT-qPCR, não

foi encontrado diferenças entre os grupos para os genes analisados (GS - *Glutamine synthetase*, SLC1A5 - *Neutral amino acid transporter B(0)*, e SLC7A5) (PEDERSEN et al., 2020). Assim como para o modelo EO771 citado anteriormente, para o modelo LLC não é possível afirmar que a redução do crescimento tumoral induzida pelo exercício foi em decorrência da diminuição do aporte de glutamina ao tumor, uma vez que não foi testado se o modelo de exercício utilizado, roda de atividade física aeróbia voluntária, reduz os níveis circulantes de glutamina durante e após a realização do exercício (PEDERSEN et al., 2020). Por fim, Pedersen *et al.* (2016) também demonstraram que o exercício realizado em roda de atividade física aeróbia voluntária 4 semanas antes da injeção das células tumorais e por mais 15 dias após a injeção das células tumorais reduziu o crescimento tumoral LLC. Além disso, o exercício induziu, no tumor LLC, um aumento da expressão gênica de IL-1 β (*Interleukin-1 beta*), iNOS (*Nitric oxide synthase, inducible*), NKG2D (*NKG2-D type II integral membrane protein*) e FoxP3 (PEDERSEN et al., 2016).

Utilizando modelo PDX de câncer de pulmão de células não pequenas, modelo no qual foi inserido um fragmento tumoral (~3mm $\times$ 2mm) do paciente em camundongos imunodeficientes NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2*^{rgtm1Wjl}/SzJo subcutaneamente, Martín-Ruiz *et al.* (2020) demonstraram que o exercício em esteira iniciado após o tumor atingir ~100mm³ reduziu o crescimento tumoral e a proliferação celular tumoral (imuno-histoquímica para Ki67), não alterando a porcentagem de áreas necróticas (análise de H&E), porcentagem de células apoptóticas (imunofluorescência para TUNEL) e a porcentagem de neutrófilos e monócitos/eosinófilos (análise de citometria de fluxo). Entretanto, não houve alteração do crescimento tumoral quando o exercício foi combinado com a imunoterapia para anti-PD-1 (*Programmed cell death protein 1*), ou mesmo quando os camundongos receberam apenas a imunoterapia para anti-PD-1 em comparação aos camundongos controle. Embora não tenha sido observada alteração no crescimento tumoral pela combinação exercício+anti-PD-1, houve redução da proliferação celular tumoral. Importante ressaltar que os camundongos utilizados nesse estudo eram imunodeficientes, os quais apresentam disfunção das células T, e que a imunoterapia para anti-PD-1 é geralmente utilizada para bloquear os receptores de *checkpoint* das células T CD8⁺ (CHEN et al., 2018; MANDAL et al., 2019; RIAZ et al., 2017; WEI et al., 2017). Dessa forma, a imunoterapia com anti-PD-1 não seria a melhor estratégia para utilizar nesses camundongos. Portanto, pode-se sugerir que os efeitos do exercício sobre a redução do crescimento tumoral e da proliferação celular no modelo PDX de câncer de pulmão de células

não pequenas foi independente de alterações no sistema imune adaptativo (MARTÍN-RUIZ et al., 2020).

2.9 Câncer de próstata

Dufresne *et al.* (2019) avaliaram os efeitos do exercício físico sobre a eficiência da radioterapia sobre o câncer de próstata humano PPC-1. O exercício realizado por camundongos imunodeficientes NUDE em esteira após 7 dias da injeção das células tumorais reduziu o crescimento tumoral PPC-1. Além disso, a combinação do exercício com a radioterapia induziu uma maior redução do crescimento tumoral em comparação aos camundongos apenas exercitados. Entretanto, a radioterapia *per se* reduziu o crescimento tumoral de maneira similar à combinação exercício mais radioterapia (DUFRESNE et al., 2020). O exercício *per se* também induziu uma redução significativa da proliferação celular tumoral (imunofluorescência para Ki67) e uma tendência de redução na % de áreas necróticas tumorais (H&E), sendo que a vascularização tumoral não foi alterada pelo exercício (imuno-histoquímica para CD31). A combinação exercício mais radioterapia, e também a radioterapia isolada reduziram de forma semelhante a % de áreas necróticas tumorais e proliferação celular tumoral, bem como aumentaram a vascularização tumoral, sendo que a redução das áreas necróticas tumorais em ambos os casos foi maior que a induzida pelo exercício *per se*. Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos nessas respostas, o exercício *per se* reduziu a ativação de ERK1/2, resposta que não foi observada nos camundongos tratados com a combinação exercício mais radioterapia e radioterapia *per se*. Ademais, o exercício *per se* não alterou a ativação de Akt (*AKT serine/threonine kinase 1*), a expressão proteica de caspase 3 clivada e a apoptose (razão proteica Bax:Bcl2). Entretanto, o exercício potencializou os efeitos da radioterapia sobre a expressão proteica de caspase 3 clivada, aumentando-a. O exercício *per se* não alterou nenhum marcador relacionado ao sistema imune inato no microambiente tumoral, mais especificamente das células NK, seja por análise de H&E, imuno-histoquímica para NK1.1 e de genes associados à ativação e função das células NK. Por fim, o exercício potencializou os efeitos da radioterapia sobre esses marcadores analisados. Importante salientar que os efeitos do exercício sobre o crescimento tumoral também foram independentes de respostas do sistema imune adaptativo, uma vez que foram usados animais imunodeficientes NUDE (DUFRESNE et al., 2020).

Por fim, Hwang *et al.* (2020) avaliaram os efeitos de uma sessão aguda de exercício sobre a viabilidade das células tumorais humanas do câncer de próstata. Para isso, as células tumorais humanas do câncer de próstata andrógena responsiva, LNCaP, e andrógena não responsiva, PC3, foram incubadas com o soro de indivíduos saudáveis jovens e idosos em repouso ou após uma sessão aguda de exercício aeróbio. O exercício reduziu apenas a viabilidade das células LNCaP (andrógena responsiva) tratadas com o soro dos indivíduos idosos, enquanto que não foi observada nenhuma alteração quando ambas as células foram tratadas com o soro dos indivíduos jovens. Além disso, não foi observado nenhuma alteração no número de células tumorais tratadas com o soro dos indivíduos jovens e idosos (HWANG *et al.*, 2020).

2.10 Câncer de pâncreas

Schadler *et al.* (2016) também avaliaram os efeitos do exercício combinado ou não com a quimioterapia sobre os vasos tumorais do câncer de pâncreas PDAC-4662 (SCHADLER *et al.*, 2016). O exercício realizado em esteira e iniciado após os tumores atingirem $\sim 35\text{mm}^3$ não alterou o crescimento tumoral PDAC-4662 bem como a quantidade de estroma desmoplásico (imuno-histoquímica para tricromo de Masson) e a proliferação celular (imunofluorescência para Ki67). Semelhante aos resultados observados no tumor B16, o exercício aumentou o comprimento dos vasos tumorais (imunofluorescência para CD31), a quantidade de lumens visíveis e a % de vasos tumorais positivos para lectina (imunofluorescência para CD31 e lectina). Quando o exercício foi combinado com gemcitabina, houve uma redução do crescimento tumoral em comparação aos camundongos controle e aos camundongos tratados apenas com gemcitabina. Além disso, o tratamento *per se* com gemcitabina não alterou o crescimento tumoral em comparação aos camundongos controle. Entretanto, não é possível afirmar que a redução do crescimento tumoral induzida pela combinação exercício e gemcitabina estava associada com o remodelamento dos vasos tumorais, uma vez que em nenhum momento foram realizadas as análises dos vasos tumorais comparando-se os tumores do camundongos controles (sedentários e exercício - sem tratamento com gemcitabina) com os tumores dos camundongos tratados com gemcitabina (sedentários e exercício) (SCHADLER *et al.*, 2016).

Semelhante ao estudo de Schadler *et al.* (2016), Bedoya *et al.* (2019) avaliaram os efeitos do exercício combinado ou não com gemcitabina sobre o crescimento tumoral do modelo PDX de câncer de pâncreas em camundongos imunodeficientes NUDE (BEDOYA *et al.*, 2019). Embora o exercício realizado em esteira e iniciado após o tumor atingir 50mm³ não tenha alterado o crescimento tumoral em comparação aos camundongos sedentários, o exercício aumentou a vascularização tumoral, o comprimento dos vasos tumorais e a quantidade de lumens (imunofluorescência para CD31). Além disso, o exercício combinado com gemcitabina acelerou a regressão tumoral, bem como retardou o tempo para a recidiva em comparação aos camundongos tratados só com gemcitabina. Ademais, após a recidiva, o exercício combinado com gemcitabina induziu uma maior redução do crescimento tumoral. Importante ressaltar que a maior redução do crescimento tumoral induzida pelo exercício combinado com gemcitabina em comparação aos camundongos tratados só com gemcitabina foi independente dos efeitos agudos do exercício, uma vez que a recidiva ocorreu, aproximadamente, 20 dias após a última sessão de exercício e do tratamento com gemcitabina (BEDOYA *et al.*, 2019).

2.11 Câncer de cólon

Similar ao câncer de mama, muitos estudos avaliaram e demonstraram que o exercício físico afeta o desenvolvimento e progressão do câncer do cólon. Entretanto, a grande maioria destes estudos não se aprofundaram nos mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta.

Por exemplo, Colbert *et al.* (2003) avaliaram se o exercício poderia reduzir a formação de tumores colorretais. Utilizando o modelo transgênico C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J que desenvolve espontaneamente câncer colorretal, o exercício realizado em esteira durante 5 semanas não foi eficiente em reduzir o número e tamanho dos tumores colorretais formados em camundongos macho e fêmeas (COLBERT *et al.*, 2003).

Contrariamente ao estudo de Colbert *et al.* (2003), Baltgalvis *et al.* (2009) reportaram que o exercício realizado em esteira durante 6 semanas reduziu a formação de tumores colorretais dos camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J machos. Os autores observaram que a redução do número de tumores colorretais foi acompanhada de uma redução da expressão proteica de β -catenina nos tumores, além de um aumento de monócitos e granulócitos circulantes, bem como uma redução da massa do baço (BALTGALVIS *et al.*, 2009).

Semelhantemente aos resultados encontrados por Colbert *et al.* (2003), Puppa *et al.* (2012) demonstraram que o exercício realizado em esteira durante 8 semanas reduziu o número total de tumores colorretais formados em camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J machos (PUPPA *et al.*, 2012). Da mesma maneira, Zielinski *et al.* (2012) também demonstraram que o exercício realizado em esteira durante 11 semanas reduziu o número total de tumores colorretais formados em camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J machos.

Já McClellan *et al.* (2014) demonstraram que o exercício realizado em esteira durante 12 semanas não reduziu o número total de tumores colorretais formados, mas reduziu o número de tumores maiores que >2mm em camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J machos (MCCLELLAN *et al.*, 2014). Além disso, esse resultado foi associado com redução nos níveis de expressão gênica de F4/80, IL-12 (*Interleukin-12*), CD206 (*Macrophage mannose receptor 1*), CCL17 (*C-C motif chemokine 17*), CCL22 (*C-C motif chemokine 22*), Arg e FOXP3 nos tumores dos camundongos treinados, bem como redução da massa no baço (MCCLELLAN *et al.*, 2014).

Ju *et al.* (2008) também avaliaram se o exercício poderia reduzir a formação de tumores colorretais. Também utilizando o modelo transgênico C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J, o exercício em roda de atividade física voluntária por 6 semanas reduziu o número total de tumores colorretais formados em camundongos fêmeas. Molecularmente, o exercício foi capaz de aumentar a expressão proteica de E-caderina e reduzir a expressão proteica de β -catenina nuclear no tumor dos camundongos (JU *et al.*, 2008). Contrariamente, Vanderveen *et al.* (2020) não observaram alteração no número total de tumores colorretais formados em camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J que realizaram exercício em roda de atividade física voluntária por 5 semanas (VANDERVEEN *et al.*, 2020).

Utilizando o exercício em esteira e roda de atividade física, ambos, por 9 semanas em camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J machos e fêmeas, Mehl *et al.* (2005) observaram que apenas o exercício em esteira realizado pelos camundongos machos foi eficiente em reduzir o número de tumores colorretais formados, e que essa redução foi associada com uma redução da inflamação intestinal e da massa do baço (MEHL, 2005). Além disso, o treinamento em esteira reduziu o percentual de células positivas para F4/80, aumentou a expressão proteica de β -catenina total e fosforilada (BALTGALVIS *et al.*, 2008). Curiosamente, o treinamento reduziu a expressão proteica de Bax bem como o número de células em apoptose (BALTGALVIS *et al.*, 2008).

Resultados semelhantes também foram encontrados no estudo de Basterfiel *et al.* (2010) (BASTERFIELD; MATHERS, 2010). Utilizando o exercício em esteira por 10 semanas e o exercício em roda de atividade física também por 10 semanas, ambos, em camundongos C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J, Basterfiel *et al.* (2010) também observaram que apenas o exercício em esteira foi eficiente em reduzir o número de tumores colorretais formados, e que essa redução foi associada com aumento nos níveis de ácido butanoico e redução dos níveis de acetato nos tumores dos camundongos treinados em comparação aos tumores dos camundongos sedentários (BASTERFIELD; MATHERS, 2010).

Já Fuku *et al.* (2007) demonstram que o treinamento físico em esteira por 4 semanas, e iniciado uma semana após a injeção com 1,2-Dimetilhidrazina, um carcinógeno que induz câncer colorretal, reduziu o número de foco de criptas aberrantes no cólon de ratos, o qual é considerado uma lesão pré-neoplásica no cólon, sendo um precursor do câncer colorretal (FUKU *et al.*, 2007). Da mesma maneira, Aoi *et al.* (2010) demonstraram que o treinamento físico realizado em esteira por 6 semanas reduziu o número de foco de criptas aberrantes e de criptas aberrantes no cólon de camundongos tratados com o carcinógeno azoximetano, outra droga que induz câncer colorretal (AOI *et al.*, 2010). Além disso, o treinamento físico reduziu os níveis de expressão gênica e proteica de iNos, a expressão gênica de TNF- α (*Tumor necrosis fator alpha*) e a expressão proteica de nitrotirosina (AOI *et al.*, 2010). Diferentemente do estudo de Fuku *et al.* (2007) (FUKU *et al.*, 2007), Aoi *et al.* (2010) realizaram o treinamento físico concomitantemente com o tratamento com azoximetano (AOI *et al.*, 2010).

Aoi *et al.* (2013) também demonstram que o treinamento físico realizado em esteira durante 4 semanas, concomitantemente com o tratamento com o carcinógeno azoximetano, reduziu o número de foco de criptas aberrantes e de criptas aberrantes no cólon dos camundongos (AOI *et al.*, 2013). Esses resultados foram associados com aumento da atividade de caspase 3/7, e da expressão proteica de caspase clivada 3 e 8 nos tumores dos camundongos (AOI *et al.*, 2013). Os autores propuseram que esses resultados seriam em virtude do aumento de Sparc (*Secreted protein acidic and rich in cysteine*) circulante induzido pelo exercício, o qual promoveria o aumento de apoptose das células tumorais do câncer de cólon, uma vez que o treinamento físico realizado por camundongos nocaute corpo inteiro para Sparc não tenha alterado o número de foco de criptas aberrantes e de criptas aberrantes no cólon, bem como os marcadores de apoptose testados nos camundongos tratados com o carcinógeno azoximetano

(AOI et al., 2013). De nota, os camundongos nocaute corpo inteiro para Sparc apresentaram maior número de foco de criptas aberrantes e de criptas aberrantes no cólon em comparação com os camundongos *wild type*. Além disso, o tratamento com Sparc recombinante em dose semelhante a encontrada na circulação imediatamente após uma sessão aguda de exercício aeróbio reduziu o número de foco de criptas aberrantes e de criptas aberrantes no cólon de camundongos tratados com o carcinógeno azoximetano (AOI et al., 2013). Entretanto, embora o treinamento físico tenha aumentado os níveis circulantes de Sparc, esse aumento sistêmico não se refletiu em um aumento de Sparc nos tumores dos camundongos, sugerindo que Sparc apresente um efeito indireto sobre o desenvolvimento e crescimento do câncer colorretal.

Lu *et al.* (2018) avaliaram se as alterações metabólicas sistêmicas induzidas pelo exercício poderiam afetar diretamente o crescimento tumoral do câncer colorretal por uma possível alteração do metabolismo tumoral. Utilizando o modelo PDX de câncer colorretal de 6 pacientes, o exercício em roda de atividade física aeróbia voluntária iniciado após a injeção dos “*homogenatos*” tumorais PDX em camundongos imunodeficientes NOD.CB17-PrkdcS⁻CID-J reduziu o crescimento tumoral em 3 dos modelos PDX testados, enquanto que os outros 3 modelos PDX não tiveram o crescimento tumoral afetado pelo exercício. Para entender se a resposta ao exercícios daqueles modelos que responderem e que não responderam ao exercício estava associada à alterações metabólicas tumorais distintas, foi realizado uma metabolômica dos 6 tumores PDX testados. Assim, quando comparada a metabolômica tumoral entre os camundongos sedentários e exercitados dos modelos PDX que responderam ao exercício, o exercício alterou significativamente 19 metabólitos, a saber:

- Metabólitos significativamente aumentados nos tumores dos animais exercitados: 5,6 dihydroxyindole; pyridoxal; propionylcarnitine; inosine; adenosine diphosphate ribose; 4(glutamylamina) butanoato; adenine; N-acetylglutamic acid.

- Metabólitos significativamente diminuídos nos tumores dos animais exercitados: pyrophosphate; stearyl carnitine; xantynosine; uracil; phosphodimethylethanolamine; phosphorylcholine; duma; L-malic acid; phosphocreatine; stearic acid; phytonic acid.

Quando comparado a metabolômica entre os tumores PDX dos camundongos exercitados dos modelos PDX que não responderam ao exercício e os tumores PDX dos camundongos exercitados dos modelos PDX que responderam ao exercício, foi observado 58 metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos, a saber:

- Metabólitos significativamente diminuídos nos tumores dos camundongos exercitados que responderam ao exercício (39): Propionylcarnitine; Threonic acid; Carnosine; Adenine; Trans-hexadec-2-enoyl carnitine; Tetradecanoylcarnitine; Btaine; D-fructose; Myoinositol; L-arginine; Acetylcholine; L-carnitine; Thiamine; Taurine; Creatine; Oxidized glutathione; Cytidine monophosphate N-acetylneuramic acid; Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine; CMP-N-trimethyl-2-aminoethylphosphonate; L-phenylalanine; L-isoleucine; Niacinamide; L-alanine; L-glutamic acid; L-4-hydroxyglutamate semialdehyde; Acetamidopropanal; L-proline; coumarin; L-tyrosine; Benzoic acid; uridine 5'-monophosphate; ADP; NADH; 2-keto-deoxy-d-glycero-D-galactonic acid 9-phosphate; Inosinic acid; (R)-mevalonate.

- Metabólitos significativamente aumentados nos tumores dos camundongos exercitados que responderam ao exercício (19): Alpha-ketoisovaleric acid; 3-methyl-2-oxovaleric acid; 5-[2-carboxy-1-(1 H-imidazol-yl)ethyl]-L-cysteine; L-menthyl acetoacetato; Stearoylcarnitine; Heptadecanoyl carnitine; Cholesterol sulfate; phytanic acid; Stearic acid; Phosphocreatine; Pyrophosphate; Spermine dialdehyde; 2-aminobenzoic acid; Salsolinol; 5-methoxyindoleacetate; Beta-1,4-mannose-N-acetylglucosamine; Adenosine diphosphate ribose.

Infelizmente, não foi comparada a metabolômica entre os tumores PDX dos camundongos sedentários dos modelos PDX que não responderam ao exercício e dos tumores PDX camundongos sedentários dos modelos PDX que responderam ao exercício para verificar se haveriam diferenças metabólicas intrínsecas que poderiam ditar a resposta ao exercício. Além disso, os 6 tumores PDX utilizados não apresentavam exatamente as mesmas características, e essas diferenças poderiam estar influenciando a resposta ao exercício. Abaixo, seguem as informações sobre os tumores PDX que não responderam e responderam ao exercício:

Tabela 1: Informações sobre os tumores PDX que não responderam e responderam ao exercício. MSS: microsatellite stable. MSI: Microsatellite instability.

Tumores PDX que não responderam				Tumores PDX que responderam		
PDXs	CRC240	CRC361	BRPC12-1469	CRC282	CRC370	CRC344
Status de microsatélite	MSS	MSI	MSI	MSS	MSS	MSS
Histologia	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma
	pobremente	pobremente	pobremente	bem	moderadamente	pobremente
	diferenciado	diferenciado	diferenciado	diferenciado	diferenciado	diferenciado
Gênero	Mulher	Mulher	Homem	Homem	Homem	Homem

Por fim, como foram utilizados camundongos imunodeficientes, seria possível sugerir que os tumores PDX que não responderam ao exercício seriam mais dependentes dos efeitos do exercício sobre o sistema imune adaptativo para o controle do crescimento tumoral, enquanto que os tumores PDX que responderam seriam menos dependentes desse possível mecanismo (LU et al., 2018).

Em outro estudo que utilizou o sangue de pacientes para incubar células tumorais, Devin *et al.* (2019) avaliaram os efeitos agudos e crônicos do exercício intervalado de alta intensidade sobre a proliferação de células tumorais do câncer de cólon humano *in vitro*. O tratamento das células CaCo-2 e LoVo por 24, 48 ou 72 horas com o soro coletado imediatamente após a sessão aguda de exercício reduziu o número de células comparado às células tratadas com o soro coletado em repouso, ao passo que o soro coletado após 120 minutos do término da sessão aguda de exercício não alterou o número de células tumorais (DEVIN et al., 2019). Além disso, o número de células tumorais não foi alterado pelo tratamento das células tumorais com o soro (coletado em repouso) de indivíduos que realizaram 4 semanas de exercício intervalado de alta intensidade, sugerindo que a redução do número de células tumorais possa ser devido às alterações circulantes promovidas durante o exercício. Em ambos os casos, o exercício não alterou a proporção de células apoptóticas. Importante ressaltar que a troca completa do soro fetal bovino pelo soro dos indivíduos promoveu uma grande redução, em torno de 60%-70%, do número de células tumorais.

Por fim, Pigna *et al.* (2016) demonstraram que o exercício em roda de atividade física aeróbia iniciado após a injeção das células tumorais C26 aumentou a sobrevivência dos camundongos (PIGNA et al., 2016).

2.12 Câncer, exercício e microRNAs

Apenas dois estudos que observaram redução do crescimento tumoral induzida pelo treinamento físico investigou o papel dos microRNAs nessa resposta (ISANEJAD et al., 2016; KHORI et al., 2015). Khorl *et al.* (2015) observaram que o treinamento físico foi eficiente em reduzir a expressão do microRNA-21a-5p nos tumores de camundongos injetados com as células do câncer de mama MC4-L2. A redução da expressão do microRNA-21a-5p foi associada com o aumento da expressão gênica e proteica de PDC4 (*Pyruvate decarboxylase 4*)

e TPM1 (*Tropomyosin alpha-1 chain*), dois genes supressores tumorais (KHORI et al., 2015). Isanejad *et al.* (2016) também demonstraram que o treinamento físico reduziu o crescimento tumoral de camundongos injetados com as células tumorais do câncer de mama MC4-L2. O treinamento físico aumentou a expressão dos microRNAs-206 e let-7, diminuiu a expressão gênica de HIF-1 α e diminuiu a expressão proteica de CD31, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e Ki-67 nos tumores mamários (ISANEJAD et al., 2016). Embora, esses estudos sejam importantes para entender o papel dos microRNAs sobre a redução do crescimento tumoral induzida pelo treinamento físico, mais estudos são necessários para entender o papel dos microRNAs para a redução do crescimento tumoral induzido pelo exercício em diferentes tipos de câncer.

2.13 Pacientes

Embora muitos estudos pré-clínicos apresentem possíveis mecanismos envolvidos na redução do crescimento tumoral induzida pelo exercício, existem apenas dois estudos que avaliaram os efeitos do exercício em tumores de pacientes.

Bedoya *et al.* (2019) também avaliaram os efeitos do exercício sobre a vascularização de tumores de pacientes com câncer de próstata pré-cirurgia (BEDOYA et al., 2019). Os pacientes realizaram exercício aeróbico e de força, não supervisionado, por pelo menos 60 minutos por semana durante 6 semanas. O exercício foi realizado conjuntamente com a quimioterapia. O exercício aumentou a vascularização tumoral (imunofluorescência para CD31), a densidade microvascular (imunofluorescência para CD31) e o número de vasos maiores que 200 μ m em comparação aos pacientes controles (BEDOYA et al., 2019).

Ligibel *et al.* (2019) avaliaram os efeitos do exercício no microambiente tumoral por sequenciamento de RNA, imuno-histoquímica e imunofluorescência para diversos marcadores (LIGIBEL et al., 2019). Biopsias do tumor mamário foram colhidas previamente ao início do protocolo de exercício físico e comparadas com os tumores coletados no momento da cirurgia de remoção completa do tumor mamário, bem como com os tumores de pacientes controles que não realizaram o protocolo de exercício. As pacientes realizaram exercício aeróbico (30 – 45 minutos por sessão) e de força (20 minutos por sessão), além de terem sido encorajadas a realizarem 220 minutos por semana de exercício não supervisionado. Assim, as pacientes apresentaram uma média de envolvimento no protocolo de exercício de 29,3 dias (variação de

10 – 70 dias) entre o momento da biópsia e o momento da cirurgia de remoção do tumor. O sequenciamento de RNA revelou que o exercício não alterou significativamente a expressão de nenhum gene. Além disso, o exercício não alterou a proliferação celular (imuno-histoquímica para Ki67), a apoptose (imuno-histoquímica para caspase 3 clivada), o percentual de células T CD4⁺, de células T CD8⁺, de células CD56⁺ e de células C163⁺. O exercício apenas induziu uma tendência para a redução das células T FOXP3⁺. Essa redução do percentual de células T FOXP3⁺ poderia indicar melhora da função citotóxica das células T CD8⁺, uma vez que as células T FOXP3⁺ podem liberar PD-L1, a qual se ligará ao seu receptor nas células T CD8⁺, PD-1, para induzir o *checkpoint* dos TILs-T CD8⁺

JUSTIFICATIVA

A câncer é um processo complexo, e muitos fatores intrínsecos às células tumorais e extrínsecos ao microambiente tumoral influenciam no seu potencial tumorigênico (CARDOSO et al., 2016; CHAMMAS; DE SOUSA ANDRADE; JANCAR, 2017; ICHIM; TAIT, 2016). Portanto, há uma grande necessidade e urgência em desenvolver estratégias capazes de atenuar o desenvolvimento e o crescimento da massa tumoral. O treinamento físico aeróbio destaca-se como uma importante ferramenta no combate ao desenvolvimento da doença. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta ainda são pouco conhecidos e necessitam ser elucidados. Além disso, não foi realizado uma análise de larga escala para identificar os microRNAs diferencialmente expressos entre tumores de animais sedentários e animais treinados. Diante disso, nosso estudo será pioneiro em identificar e validar os microRNAs que são modulados pelo treinamento físico aeróbio e atenuam o crescimento tumoral do câncer de cólon.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar e validar os microRNAs diferencialmente expressos entre os tumores de camundongos com câncer de cólon sedentários e treinados.

3.2 Específicos

- I) Verificar se o treinamento físico aeróbio reduz o crescimento tumoral do câncer de cólon CT26 e MC38.
- II) Verificar se o treinamento físico aeróbio promove alterações persistentes no microambiente tumoral.
- III) Verificar se treinamento físico aeróbio promove alterações persistentes, especificamente, nas células tumorais CT26.
- IV) Através da análise de microRNA Array, identificar os microRNAs diferencialmente expressos entre os tumores de animais com câncer de cólon sedentários e treinados.
- V) Pelo menos 10 microRNAs diferencialmente expressos serão confirmados por RT-PCR no tumor e nas células tumorais CT26 primárias
- VI) Por meio de análise *in silico* serão selecionados os genes alvos de pelo menos 2 microRNAs e vias de sinalização celular reguladas por estes microRNAs selecionados.
- VII) Se forem encontrados genes alvos novos e ainda não validados na literatura para os microRNAs selecionados, estes serão validados em cultura celular por técnica de luciferase.
- VIII) Por meio de estratégias *in vitro* e *in vivo*, serão realizados testes funcionais
- IX) Por fim, nós validaremos em diferentes coortes de pacientes com câncer de cólon se os microRNAs validados *in vitro* e *in vivo* apresentam associação com a sobrevida de pacientes com câncer cólon.

4 RESULTADOS

4.1 Treinamento físico aeróbio reduz o crescimento tumoral do câncer de cólon CT26 e aumenta a sobrevida

Primeiramente, nós avaliamos os efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral do câncer de cólon CT26. O treinamento físico foi realizado em esteira durante 8 semanas antes da injeção das células e continuou após a primeira identificação palpável do tumor (**Figura 3A**). O treinamento físico reduziu o crescimento tumoral bem como retardou a primeira identificação palpável da massa tumoral em comparação aos camundongos sedentários (**Figura 3B-3C**). Para verificar o comportamento do desenvolvimento da massa tumoral, nós realizamos ensaio de luciferase nos primeiros dias após a injeção das células tumorais. Após o primeiro dia da injeção das células tumorais, não houve diferença entre os grupos, enquanto que após 6 dias da injeção das células tumorais, o treinamento físico promoveu menor intensidade de luciferase tumoral (**Figura 3D-3E**), corroborando com os resultados encontrados pela 1ª identificação palpável do tumor (**Figura 3C**). Por fim, o treinamento físico também aumentou a sobrevida dos camundongos em comparação aos camundongos sedentários (**Figura 3F**). Juntos, esses resultados demonstram que o treinamento físico reduz o crescimento tumoral CT26 e aumenta a sobrevida dos camundongos.

Figura 3. Efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral. **A:** Desenho Experimental. **B:** Volume tumoral durante o curso temporal. **C:** Porcentagem de camundongos sem tumor. **D:** Intensidade de luciferase pós 1 e 6 dias da injeção das células tumorais. **E:** Imagem mostrando o ensaio de luciferase. **F:** Sobrevida dos camundongos sedentários e treinados injetados com as células CT26. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas Log-rank para o surgimento tumoral e sobrevida, e análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; p*** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

O modelo de câncer de cólon CT26 é conhecido por promover uma série de alterações sistêmicas no organismo como, por exemplo, a caquexia do câncer (perda de tecido adiposo e massa muscular) (CHEN et al., 2016; KIM et al., 2016; KIM; IM; MA, 2018; LIN; CHEN, 2017) e esplenomegalia (Tobias *et al.*, dados não publicados). Nós observamos que os camundongos treinados sacrificados após 19 dias da injeção das células tumorais apresentaram uma atenuação do aumento da massa do fígado e do baço em comparação aos camundongos sedentários (**dados não mostrados**). Entretanto, como os camundongos treinados apresentaram um volume tumoral menor que dos camundongos sedentários no momento do sacrifício (**Figura 3B**), os resultados encontrados poderiam estar associados ao menor volume tumoral do que aos efeitos do treinamento físico *per se*. Portanto, para determinar os efeitos do treinamento físico sobre as alterações sistêmicas promovidas pelo tumor CT26, nós sacrificamos os animais, individualmente, quando o tumor atingiu um volume tumoral de, aproximadamente, 600 mm³ (**Figura 4A-4C**). Com essa estratégia, nós observamos que o treinamento físico apresentou uma tendência em atenuar a perda de massa do músculo sóleo (**Figura 4E**), atenuou a perda de massa do músculo gastrocnêmio (**Figura 4F**) e atenuou o aumento de massa do baço e fígado (**Figuras 4G e 4H**). Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento físico é capaz de atenuar os efeitos sistêmicos do tumor CT26, independentemente do volume tumoral.

Figura 4. Efeitos do treinamento físico sobre as alterações sistêmicas do tumor CT26. Os camundongos foram sacrificados individualmente quando o tumor atingiu, aproximadamente, 600 mm³. **A:** Desenho Experimental. **B:**

Volume tumoral. **C:** Massa tumoral. **D:** Massa do tibial anterior (TA). **E:** Massa do sóleo. **F:** Massa do gastrocnêmio. **G:** massa do baço. **H:** Massa do fígado. **I:** Massa do coração. **J:** massa do tecido adiposo branco. **K:** Massa do tecido adiposo marrom. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e a ANOVA de um fator. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

4.2 Treinamento físico aeróbio promove alterações persistentes no microambiente tumoral e nas células tumorais

Embora seja conhecido que o exercício físico altere o microambiente tumoral, como, por exemplo, pela melhora da funcionalidade dos vasos tumorais e aumento do infiltrado de células imunes, ainda é desconhecido se o exercício físico é capaz de prover alterações persistentes no microambiente e nas células tumorais que sejam capazes de reduzir a sua tumorigênese. Para verificar se o treinamento físico seria capaz de prover alterações persistentes sobre o crescimento tumoral, nós enxertamos em novos camundongos sedentários um pequeno fragmento do tumor de aproximadamente 5mm³ proveniente dos camundongos sedentários (“enxerto tumoral sedentário” – f1SED+CT26 – primeira passagem) e dos camundongos treinados (“enxerto tumoral treinado” – f1TR+CT26 – primeira passagem) que foram sacrificados após 19 dias da injeção das células tumorais (**Figura 5A**). Os camundongos que receberam o “enxerto tumoral treinado” apresentaram uma redução do crescimento tumoral em comparação aos animais que receberam o “enxerto tumoral sedentário” (**Figura 5B**). Para verificar a reprodutibilidade e a persistência dos resultados encontrados, nós enxertamos em novos animais sedentários um pequeno fragmento de tumor dos animais f1SED+CT26 e do tumor dos animais f1TR+CT26. Novamente, os animais que receberam o “enxerto tumoral treinado” apresentaram uma redução do crescimento tumoral em comparação aos animais que receberam o enxerto tumoral sedentário (**Figura 5C**).

Uma vez que a estratégia de enxerto tumoral apresenta uma série de limitações, como a quantidade de células tumorais contidas em cada fragmento, nós realizamos uma cultura celular primária a partir de um “pool” dos tumores f2SED+CT26 (“células tumorais sedentárias”) e um “pool” dos tumores f2TR+CT26 (“células tumorais treinadas”) para verificar se os mesmos resultados seriam observados com a injeção de uma mesma quantidade de células tumorais em novos camundongos sedentários (**Figura 5D**). Os animais que foram injetados com as “células tumorais treinadas” apresentaram uma redução do crescimento tumoral em comparação aos

animais que foram injetados com as “células tumorais sedentárias” (**Figura 5E**). Para verificar a reprodutibilidade e persistência dos resultados encontrados, nós geramos uma nova cultura celular primária a partir de um “pool” dos tumores provenientes dos tumores c1SED+CT26 e um “pool” dos tumores c1TR+CT26. Novamente, os animais que receberam as “células tumorais treinadas” apresentaram uma redução do crescimento tumoral em comparação aos camundongos que receberam as “células tumorais sedentárias” (**Figura 5F**). Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento físico promove alterações persistentes no microambiente tumoral e também nas células tumorais.

Figura 5. Efeitos persistentes do treinamento físico sobre o crescimento tumoral. **A:** Desenho experimental para o enxerto tumoral. **B:** Crescimento tumoral do enxerto proveniente do tumor dos animais SED+CT26 e dos animais TR+CT26. Primeira passagem (f1). **C:** Crescimento tumoral do enxerto proveniente do tumor dos animais f1SED+CT26 e dos animais f1TR+CT26. Segunda passagem (f2). **D:** Desenho experimental para a geração das células CT26 primárias. **E:** Crescimento tumoral das células tumorais proveniente do tumor dos animais f2SED+CT26 e dos animais f2TR+CT26. Primeira passagem (c1). **F:** Crescimento tumoral das células tumorais proveniente do tumor dos animais c1SED+CT26 e dos animais c1TR+CT26. Segunda passagem (c2). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada a análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Como a nossa cultura de células primárias foi gerada a partir dos tumores da segunda passagem dos enxertos, além de ter sido realizado um “pool” desses tumores para a geração dessas células tumorais “sedentárias” e “treinadas”, ou seja, essas células não foram originadas individualmente a partir dos tumores de camundongos sedentários e treinados, nós geramos as células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas” diretamente do tumor de camundongos sedentários e treinados, além de termos gerado individualmente as células a partir de cada um dos tumores desses camundongos.

Primeiramente, nós observamos que o treinamento físico reduziu o crescimento tumoral, a massa tumoral e retardou a primeira identificação tumoral (**Figuras 6A-6D**). Além disso, o treinamento físico foi eficiente para impedir o aumento da massa corporal após as 8 semanas de treinamento (**Figura 6E**). Após a injeção das células tumorais, o treinamento também atenuou a perda de massa corporal induzida pelo tumor CT26 (**Figura 6F**). Por fim, nós observamos que o treinamento físico atenuou a perda de massa do tecido adiposo branco (**Figura 6G**) bem como atenuou o aumento da massa do fígado (**Figura 6H**) e do baço (**Figura 6I**).

Figura 6. Efeitos do treinamento físico sobre as células tumorais CT26. **A:** Desenho experimental. **B:** Volume tumoral durante o curso temporal. **C:** Massa tumoral. **D:** Porcentagem de camundongos sem tumor. **E:** Massa corporal pré e após as 8 semanas de treinamento físico. **F:** Delta da massa corporal considerando o dia da injeção das células tumorais e o momento do sacrifício dos camundongos. A massa tumoral foi descontada para as análises. **G:** massa do tecido adiposo branco. **H:** Massa do fígado. **I:** massa do baço. Dados apresentados como média $\pm$

erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal, Log-rank para o surgimento tumoral, ANOVA de um fator e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

4.3 Alterações persistentes nas células tumorais induzidas pelo treinamento físico são observadas em camundongos imunocompetentes mas não em camundongos imunodeficientes

Após confirmarmos que o treinamento físico reduziu o crescimento tumoral (**Figuras 6B-6C**), nós geramos as células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas”, individualmente, a partir do tumor de cada camundongo e as injetamos em novos camundongos sedentários (**Figura 7A**). Como recentemente foi demonstrado que o exercício físico melhora a função antitumoral das células T CD8⁺ (RUNDQVIST et al., 2020), nós também injetamos as células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas” em camundongos imunodeficientes NUDE (camundongos que não produzem células T maduras e apresentam uma redução no número de linfócitos circulantes) para comparar a resposta do crescimento tumoral com as células CT26 primárias “sedentárias e “treinadas” injetadas em camundongos imunocompetentes Balb/c. Similar aos resultados encontrados nas **Figuras 5E-5F**, as células tumorais “treinadas” também apresentaram menor crescimento tumoral em comparação às células tumorais “sedentárias” em camundongos imunocompetentes Balb/c (**Figura 7B**). Entretanto, não houve alteração do crescimento tumoral (**Figura 7C**) e da intensidade de luciferase (**Figura 7D**) nos camundongos imunodeficientes NUDE, sugerindo que as alterações induzidas pelo exercício em camundongos imunocompetentes nas células CT26 primárias são dependentes das células T para que ocorra a redução do crescimento tumoral.

Figura 7: Efeitos do treinamento físico sobre as células tumorais CT26. **A:** Desenho experimental para a geração das células CT26 primárias. As células tumorais primárias foram geradas individualmente de cada um dos tumores dos camundongos sedentários e treinados (denominadas como células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26). Após as

células CT26 primárias terem sido geradas, elas foram injetadas em camundongos imunocompetentes Balb/c e em camundongos imunodeficientes NUDE. **B:** Volume tumoral durante o curso temporal para os camundongos imunocompetentes Balb/c e gráfico demonstrando o crescimento individual dos tumores. **C:** Volume tumoral durante o curso temporal para os camundongos imunodeficientes NUDE e gráfico demonstrando o crescimento individual dos tumores. **D:** Intensidade de luciferase dos tumores *ex vivo* crescidos nos camundongos imunodeficientes e imagem mostrando o ensaio de luciferase. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e análise de medidas repetidas por modelo misto. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

4.4 Treinamento físico reduz a viabilidade celular e formação de colônias das células CT26

Uma vez que nossos resultados indicaram que as alterações induzidas pelo treinamento físico nas células CT26 primárias parecem ser dependentes das células T para que ocorra a redução do crescimento da massa tumoral, nós avaliamos se a viabilidade, potencial de colonização e a migração celular não seriam similares entre células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas”. Interessantemente, houve uma redução da viabilidade celular e formação de colônias nas células CT26 “treinadas” (**Figuras 8A-8B**), enquanto que não foi observada nenhuma alteração na migração celular (**Figura 8C**). A redução da viabilidade celular e da formação de colônias não foi acompanhado de uma redução da expressão gênica de nenhum dos 9 marcadores de proliferação celular analisados (**Figura 8D**). Além disso, houve um aumento na expressão gênica de Top2a (*DNA topoisomerase II alpha*) nas células CT26 primárias “treinadas” (**Figura 8D**). Embora seja reportado que o aumento da expressão de Top2a esteja relacionado com o aumento da proliferação celular (CHEN et al., 2015) em diferentes tipos de células tumorais, pior prognóstico do paciente com câncer (CHEN et al., 2015; LABBÉ et al., 2017) e resistência aos tratamentos do câncer (CHEN et al., 2015), o aumento da expressão de Top2a nos tumores de diferentes coortes de pacientes com câncer de cólon está associado com uma maior sobrevida do paciente (**Figuras 8E-8I**). Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento físico também é capaz de reduzir a viabilidade celular e formação de colônias *in vitro* e que esses resultados não estão associados com uma redução da expressão gênica de marcadores de proliferação celular (Top2a, Eif2 - *Eukaryotic translation initiation factor 2*, Mcm2 - *Minichromosome maintenance complex component 2*, Mcm3 - *Minichromosome maintenance complex component 3*, Mcm4 - *Minichromosome maintenance complex component 4*, Mcm5 - *Minichromosome maintenance complex component 5*, Mcm6 - *Minichromosome maintenance complex component 6*, Ccnd - *G1/S-specific cyclin-D*, e Foxm1 - *Forkhead box M1*).

Figura 8: Efeitos do treinamento físico sobre as células tumorais CT26. **A:** Ensaio de viabilidade celular por MTT das células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26. **B:** Ensaio de formação de colônias das células tc1SED+CT26 e

tcTR+CT26. **C:** Ensaio de migração em transwell das células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26. Intensidade de luciferase das células que migraram e imagem mostrando o ensaio de luciferase. **D:** Análise de RT-qPCR das células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26 para marcadores relacionados à proliferação celular. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001. **E:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>). **F:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Colon Adenocarcinoma – TCGA – 286 – rsem – tcgars” (<http://r2.amc.nl>). **G:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>). **H:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rma – u133p2” (<http://r2.amc.nl>). **I:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão TOP2A (vermelho) e baixa expressão de TOP2A (azul). A sobrevida foi calculada com ULCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) utilizando amostras de pacientes com câncer de cólon do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

4.5 Treinamento físico reduz o crescimento tumoral CT26 em camundongos imunodeficientes

Tendo observado que os tumores provenientes das células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas” cresceram de maneira similar nos camundongos imunodeficientes NUDE, e que as células tumorais “treinadas” apresentam uma redução da viabilidade celular e formação de colônias *in vitro*, nós analisamos os efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral em camundongos imunodeficientes NUDE. Os camundongos NUDE foram treinando durante 4 semanas antes da injeção das células tumorais CT26 e posteriormente após a primeira identificação palpável do tumor (**Figura 9A**). Mesmo na ausência de células T maduras, o treinamento físico foi eficiente em reduzir o crescimento tumoral (**Figuras 9B-9D**), sem ser observada alteração na intensidade da luciferase (**Figura 9E**). Além disso, houve uma tendência para a redução da caquexia induzida pelo tumor CT26 nos camundongos treinados (**Figura 9F-9G**) bem como para a atenuação da perda da massa do músculo tibial anterior (TA) (**Figura 9K**). Por fim, não houveram diferenças nas massas do baço (**Figura 9H**), do fígado (**Figura 9I**), do coração (**Figura 9J**) e do tecido adiposo branco (**Figura 9L**), sugerindo que a atenuação da perda da massa corporal esteja associada com a atenuação da perda de massa muscular esquelética e não do tecido adiposo branco. Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento físico é capaz de reduzir o crescimento tumoral CT26 e atenuar a caquexia do câncer independentemente da presença de células T maduras.

Figura 9. Efeitos do treinamento físico em camundongos imunodeficientes NUDE sobre crescimento tumoral CT26. **A:** Desenho experimental. **B:** Volume tumoral durante o curso temporal. **C:** Volume tumoral ex vivo. **D:** Massa tumoral. **E:** Intensidade da luciferase tumoral durante o curso temporal. **F:** Massa corporal durante todo o protocolo experimental, descontando-se a massa tumoral no momento do sacrifício. **G:** Delta da massa corporal considerando o dia da injeção das células tumorais e o momento do sacrifício dos camundongos. A massa tumoral foi descontada para as análises. **H:** Massa do baço. **I:** massa do fígado. **J:** massa do coração. **K:** massa do músculo tibial anterior (TA). **L:** Massa do tecido adiposo branco (WAT). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não

pareados bicaudal e análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.6 Treinamento físico reduz a metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26

O modelo de câncer de cólon CT26 também é conhecido por gerar metástase espontânea no pulmão quando as células são injetadas subcutaneamente (STROBEL STEVENS et al., 1980). Diante disso, nós avaliamos os efeitos do treinamento físico sobre a formação de tumores metastático no pulmão em diferentes condições experimentais.

Primeiramente, para simular o que geralmente ocorre na clínica, nós removemos o tumor primário após 17 dias da injeção das células tumorais (tumores com $\sim 500\text{mm}^3$) e sacrificamos os camundongos após 9 dias da cirurgia de remoção do tumor primário (**Figura 10A**). Os camundongos treinaram durante 8 semanas antes da injeção das células tumorais e posteriormente após a primeira identificação palpável do tumor até o 16º dia após a injeção das células tumorais (**Figura 10A**). Após o 3º dia da remoção do tumor, os camundongos retornaram ao treinamento até o 8º dia. Nesse grupo de camundongos, houve uma tendência de redução do crescimento tumoral CT26 nos camundongos treinados (**Figura 10B-10C**). No dia da cirurgia de remoção do tumoral, os camundongos de ambos os grupos apresentaram uma redução de aproximadamente 6% da massa corporal (**Figura 10D**). Interessantemente, após a remoção do tumor, os camundongos começaram a recuperar a massa corporal até o 5º dia, momento no qual foi observado uma massa corporal semelhante à observada no dia da injeção das células tumoral ($SED+CT26$: dia 0 = 25,54 – dia +5 = 25,13; $TR+CT26$: dia 0 = 23,77 – dia +5 = 23,58) (**Figura 10E**). Além disso, após o 9º dia da remoção do tumor, os camundongos sedentários começaram a apresentar uma redução da massa corporal em comparação ao dia da injeção das células tumorais, enquanto que essa diferença não foi notada para os camundongos treinados (**Figura 10E**). Por fim, não houve alteração na massa do coração, fígado, baço e tecido adiposo branco (**Figuras 10F-10I**).

Figura 10: Efeitos do treinamento físico sobre a formação de metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26. **A:** Desenho experimental para o protocolo de remoção do tumor. **B:** Volume tumoral até o dia da remoção do tumor. **C:** Intensidade da luciferase tumoral 11 dias após a injeção das células tumorais e imagem mostrando o ensaio de

luciferase. **D:** Delta da massa corporal do momento da injeção das células tumorais até o dia da remoção do tumor. **E:** Massa corporal durante todo o protocolo experimental. Massa tumoral. **F:** Massa do coração. **G:** Massa do fígado. **H:** massa do baço. **I:** Massa do tibial anterior (TA). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Após o 4º dia da remoção do tumor, 7 camundongos sedentários já apresentavam metástases pulmonares detectáveis, *in vivo*, enquanto que apenas 2 camundongos treinados apresentavam metástases pulmonares (**Figura 11A**). Quando analisado a formação de metástase pulmonares *ex vivo* após o 9º dia da cirurgia de remoção do tumor, apenas um camundongo sedentário e um treinado não apresentaram metástase pulmonar (**Figura 11B**), sendo que não houve diferença entre os grupos (**Figura 11B**). Importante ressaltar que 2 camundongos sedentários morreram em decorrência da metástase pulmonar antes das análises *ex vivo* do pulmão, fator esse que poderia determinar uma possível diferença estatística entre os grupos.

Figura 11: Efeitos do treinamento físico sobre a formação de metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26. **A:** Intensidade da luciferase no pulmão, *in vivo*, após 4 dias da remoção do tumor. As setas pretas indicam as metástases pulmonares. **B:** Intensidade da luciferase no pulmão, *ex vivo*, após 9 dias da remoção do tumor. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Uma vez que o volume tumoral no momento da cirurgia de remoção do tumor poderia ser um fator de confusão para as análises, nós analisamos individualmente o pulmão dos animais quando o tumor primário (subcutâneo) atingiu $\sim 1000 \text{ mm}^3$ (**Figura 12A**). Para os animais utilizados nesse protocolo experimental, nós observamos que o treinamento físico reduziu o crescimento tumoral e promoveu um atraso no tempo para o tumor atingir 1000 mm^3

(**dados não mostrados**). Entretanto, quando analisado a massa do pulmão e a intensidade de luciferase, não foi observada diferença entre os grupos (**Figura 12A-12B**). Como a mediana do tempo para que os camundongos treinados apresentassem um volume tumoral de 1000mm^3 foi de 30 dias (**dados não mostrados**), enquanto que para os camundongos sedentários a mediana foi de 20 dias (**dados não mostrados**), esta diferença de tempo de 10 dias entre o sacrifício dos camundongos sedentários e treinados poderia justificar os resultados encontrados. Além disso, o baixo número de camundongos utilizados na análise bioluminescência também poderia justificar os resultados encontrados.

Como os camundongos que foram sacrificados individualmente com tumores de $\sim 600\text{mm}^3$ foram sacrificados em tempos próximos (**dados não mostrados**), nós analisamos a formação de metástase pulmonar desses camundongos. Uma vez que as células CT26 apresentavam expressão estável do gene luciferase, nós analisamos a expressão gênica de luciferase para verificar a formação de metástase pulmonar. Para diminuir uma possível variabilidade entre as amostras, nós liofilizamos o pulmão inteiro, tornando-o pó, e preparamos o cDNA das amostras a partir do liofilizado pulmonar. Assim, nós observamos que o treinamento físico gerou uma menor magnitude de aumento na massa do pulmão (**Figura 12C**) bem como uma redução significativa na expressão gênica de luciferase (**Figura 12C**). Nós também avaliamos a massa pulmonar de nossas diferentes condições experimentais. O treinamento físico também reduziu a massa do pulmão nos camundongos imunodeficientes NUDE (**Figura 12D**) e induziu uma menor magnitude de aumento da massa do pulmão naquele grupo de camundongos que foi utilizado para a geração individual das células CT26 primárias (**Figura 12E**). Já nos camundongos que receberam as células CT26 primárias sedentárias e treinadas, não houve diferença entre os grupos (**Figura 12F**).

Figura 12: Efeitos do treinamento físico sobre a formação de metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26. **A:** Massa pulmonar dos camundongos sacrificados individualmente com 1000mm³. **B:** Intensidade da luciferase no

pulmão, *ex vivo*, dos camundongos sacrificados individualmente com 1000mm³ e imagem do ensaio de luciferase. **C:** Massa pulmonar dos camundongos sacrificados individualmente com 600mm³ e RT-qPCR para luciferase do pulmão. **D:** Massa pulmonar dos camundongos imunodeficientes NUDE. **E:** Massa pulmonar dos camundongos que foi realizado a geração das células CT26 primárias a partir de cada um dos tumores individualmente. **F:** Massa pulmonar dos camundongos injetados com as células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26. Os gráficos de volume tumoral indicam a origem da amostra analisada. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e a ANOVA de um fator. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

4.7 Treinamento físico reduz o consumo de exossomos derivados das células CT26 pelas regiões metastáticas

Recentemente foi demonstrado que os exossomos liberados pelas células tumorais são um importante fator envolvido na formação da metástase, mais especificamente, na formação do nicho pré-metastático, promovendo a angiogênese e coagulação, modulando o sistema imune, e remodelando o tecido parenquimal, os quais, juntos, suportam a progressão do tumor metastático (BECKER et al., 2016; JOHNSON et al., 2016; MINCIACCHI et al., 2015; PEINADO et al., 2012; POL et al., 2012; QUAIL; JOYCE, 2013; RATAJCZAK et al., 2006). Diante disso e dos resultados encontrados anteriormente, nós verificamos se a redução da metástase promovida pelo treinamento físico poderia estar associada com uma possível redução do consumo dos exossomos derivados das células CT26 pelas regiões metastáticas.

Nós usamos ultracentrifugações sequenciais para isolar os exossomos das células CT26 para então injetarmos, retro orbitalmente, 10 μ g dos exossomos marcados fluorescentemente com NIR (do inglês *near infrared* - CellVue® Burgundy Fluorescent Cell Labeling Kit) em camundongos Balb/c treinados durante 4 semanas (24 horas após a última sessão de treinamento – camundongos sem tumores) e imediatamente após uma sessão de exercício (60 minutos – camundongos não treinados e sem tumores), e, 24 h após a injeção, foi quantificado a biodistribuição dos exossomos em órgãos distantes (pulmão, fígado, linfonodo, baço, tibia/fêmur) (**Figura 13A**). O treinamento físico também foi eficiente em reduzir o consumo dos exossomos das células CT26 no pulmão, linfonodo e baço (**Figura 13B**), corroborando com os resultados encontrados anteriormente (**Figuras 10-12**). Curiosamente, imediatamente após uma sessão aguda de exercício houve um aumento no consumo de exossomos no pulmão dos camundongos em comparação aos camundongos não exercitados (**Figura 13C**). Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento físico reduz a formação de metástase pulmonar, e que um dos possíveis mecanismos envolvidos nessa resposta esteja relacionado com a capacidade

do treinamento em reduzir consumo dos exossomos tumorais pelo pulmão, e que essa redução possa estar associada com os efeitos do treinamento no tecido pulmonar *per se*, uma vez que imediatamente após uma sessão aguda de exercício houve um aumento do consumo de exossomos tumorais pelo pulmão.

Figura 13: Efeitos do treinamento físico sobre o consumo de exossomos derivados das células CT26. **A:** Desenho experimental. **B:** Análise de biodistribuição dos exossomos derivados das células CT26 injetados em camundongos treinados por 4 semanas. A injeção dos exossomos foi realizada 24 horas após a última sessão de treino. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a injeção dos exossomos e os tecidos inteiros foram analisados

pelo Odyssey. **C:** Análise de biodistribuição dos exossomos derivados das células CT26 injetados imediatamente após uma única sessão aguda de exercício. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a injeção dos exossomos e os tecidos inteiros foram analisados pelo Odyssey. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

Uma vez que o treinamento físico foi eficiente em reduzir o consumo dos exossomos tumorais pelo pulmão, linfonodo e baço, nós iniciamos um estudo para verificar se o treinamento físico também poderia alterar a liberação, conteúdo, organotropismo e capacidade de formar nichos pré-metastáticos dos exossomos das células CT26 primárias “treinadas”. Até o momento, nós isolamos os exossomos de apenas 1 de 12 células CT26 primárias “sedentárias” e 1 de 12 células CT26 primárias “treinadas”, e realizamos os ensaios de análise de rastreamento de nanopartículas (**Figura 14A**) e microscopia eletrônica (**Figura 14B**). Entre essas duas células CT26 primárias testadas, não pareceu haver diferença na liberação (**Figura 14C**) e no tamanho (**Figura 14D**) dos exossomos. Após coletarmos os exossomos de todas as células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas”, e realizar os ensaios de análise de rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica e biodistribuição, nós injetaremos os exossomos dessas células CT26 “sedentárias” e “treinadas” diariamente durante 4 semanas em camundongos sedentários, e após esse período, nós injetaremos as células tumorais CT26 parentais para avaliar se os exossomos das células CT26 primárias “treinadas” induzem uma menor formação de metástase pulmonar.

Figura 14: Efeitos do treinamento físico sobre a liberação de exossomos derivados das células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas”. **A:** Gráfico representativo das análises de rastreamento de nanopartículas (NTA) de 1 células CT26 primária “sedentária” (tc1SED+CT26) e de 1 célula CT26 primárias “treinada” (tc1TR+CT26) mostrando a concentração e tamanho dos exossomos. **B:** Imagens representativas de microscopia eletrônica de 1 células CT26 primária “sedentária” (tc1SED+CT26) e de 1 célula CT26 primárias “treinada” (tc1TR+CT26). **C:** Concentração de exossomos por 10⁶ células. **D:** Tamanho dos exossomos. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

4.8 Treinamento físico reduz o crescimento tumoral MC38

Por fim, para verificar se o treinamento físico também poderia reduzir o crescimento tumoral em outro modelo de câncer de cólon, nós utilizamos as células tumorais do câncer de cólon MC38. Ao contrário do tumor CT26 que se desenvolve em camundongos Balb/c, o tumor de câncer de cólon MC38 desenvolve-se em camundongos C57Bl6, fornecendo-nos não só os efeitos do treinamento físico em outro modelo de câncer de cólon, mas também em outra linhagem de camundongos. Utilizando o mesmo protocolo de treinamento físico e de injeção das células tumorais (**Figura 15A**) usado para os camundongos Balb/c, nós observamos que o treinamento físico inibiu a taxa de crescimento do tumor MC38 (**Figura 15B-15C**) bem como retardou a primeira identificação palpável tumoral (**Figura 15D**). Surpreendentemente, os tumores MC28 dos camundongos treinados se estabilizaram com $\sim 300\text{mm}^3$ (**Figuras 15B-15C**). Esse efeito pronunciado do treinamento físico sobre o crescimento tumoral talvez possa ser explicado pelo fato do tumor MC38 ser bem menos agressivo que o tumor CT26, o qual apresenta uma menor taxa de crescimento (**Figura 15B-15D**), não induz caquexia pronunciada (**Figura 15E, 15I, 15J**), não induz esplenomegalia (**Figura 15G**) e parece ser menos invasivo, portanto, necessita de um tempo muito maior, além de tumores muito maiores, para formar metástase pulmonar. Por fim, o treinamento físico inibiu a perda de massa do coração (**Figura 15H**) e do músculo TA (**Figura 15J**). Juntos, esses resultados demonstram que o treinamento físico é capaz de reduzir o crescimento tumoral dos modelos de câncer de cólon CT26 e MC38, atenuar a caquexia induzida pelo tumor CT26, aumentar a sobrevivência dos camundongos com os tumores CT26, apresenta uma tendência em reduzir a metástase pulmonar induzida pelo tumor CT26 bem como reduz o consumo dos exossomos derivados das células CT26 pelo pulmão, linfonodo e baço, mostrando-se como uma importante ferramenta para o combate ao desenvolvimento do câncer de cólon.

Figura 15: Efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral MC38. **A:** Desenho experimental. **B:** Volume tumoral durante o curso temporal. **C:** Massa tumoral. **D:** Porcentagem de camundongos sem tumor. **E:**

Massa corporal durante todo o protocolo experimental. **F**: Massa do pulmão. **G**: Massa do baço. **H**: Massa do coração. **I**: Massa do tecido adiposo branco. **J**: Massa do músculo tibial anterior (TA). **K**: Massa do fígado. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foram utilizadas o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal, Log-rank para o surgimento tumoral, ANOVA de um fator e análise de medidas repetidas por modelo misto. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.9 Treinamento físico reduz globalmente a expressão do microRNAs

Para verificar se os microRNAs apresentam um papel na redução do crescimento tumoral induzida pelo treinamento físico, nós realizamos um microRNA *array* dos tumores SED+CT26 e TR+CT26 para identificar os microRNAs diferencialmente expressos. Para selecionar os microRNAs diferencialmente expressos, nós selecionamos aqueles com um *fold change* > 2 ou < -2 ; com um valor de $p < 0.05$ e com um FDR (*False discovery rate*) < 0.01 . Utilizando esses critérios, nós identificamos que o treinamento físico regulou negativamente a expressão de 211 microRNAs e não regulou positivamente a expressão de nenhum microRNA (**Figura 16A-16C e Tabela 2**).

Figura 16. A: Critérios adotados para a seleção dos microRNAs e resultados encontrados. **B:** *Heatmap* representando os níveis de expressão dos microRNAs (log2) diferencialmente expressos selecionados. **C:** *Volcano plot* apresentando os valores de *fold change* dos microRNAs encontrados no tumor dos animais treinados, registrados em função dos valores de FDR P-val.

Tabela 2. Lista de microRNAs diferencialmente expressos com um *fold change* > 2 ou < -2; com um valor de p < 0.05 e com um FDR < 0.01 no tumor CT26 de camundongos sedentários e treinados após 19 dias da injeção das células tumorais.

Fold Change	P-val	FDR P-val	Transcript ID (Array Design)		Fold Change	P-val	FDR P-val	Transcript ID (Array Design)
-7.16	1.45E-05	0.0002	mmu-miR-470-5p		-2.58	9.98E-05	0.0007	mmu-miR-1231-3p
-5.58	0.0002	0.0013	mmu-miR-6769b-3p		-2.57	6.23E-06	8.54E-05	mmu-miR-6905-5p
-5.28	2.14E-07	7.69E-06	mmu-miR-6927-5p		-2.55	0.0018	0.0062	mmu-miR-667-5p
-5.17	3.82E-07	1.22E-05	mmu-miR-299a-3p		-2.55	0.0008	0.0034	mmu-miR-7012-5p
-5.01	2.12E-06	3.93E-05	mmu-miR-6962-5p		-2.54	1.81E-05	0.0002	mmu-miR-664-5p
-4.64	0.0005	0.0022	mmu-miR-7578		-2.53	0.0021	0.0069	mmu-miR-3095-5p
-4.46	0.0001	0.0007	mmu-miR-760-5p		-2.52	0.0002	0.0012	mmu-miR-8090
-4.44	0.0031	0.0096	mmu-miR-154-3p		-2.51	0.0004	0.002	mmu-miR-7076-5p
-4.33	4.41E-08	2.79E-06	mmu-miR-7223-5p		-2.51	1.42E-05	0.0002	mmu-miR-7679-3p
-4.17	0.0003	0.0014	mmu-miR-344c-5p		-2.49	0.001	0.0039	mmu-miR-7080-5p
-4.16	2.50E-06	4.33E-05	mmu-miR-7226-5p		-2.49	2.39E-07	8.38E-06	mmu-miR-7222-5p
-4.12	0.001	0.0041	mmu-miR-467g		-2.49	4.73E-06	6.84E-05	mmu-miR-6361
-4.1	2.02E-08	1.90E-06	mmu-miR-491-5p		-2.46	0.0007	0.0029	mmu-miR-21a-3p
-4.09	0.0018	0.0061	mmu-miR-1902		-2.46	0.0003	0.0014	mmu-miR-6900-3p
-4.02	7.17E-05	0.0005	mmu-miR-6932-3p		-2.45	0.0001	0.0009	mmu-miR-1306-3p
-4	0.0009	0.0036	mmu-miR-3098-3p		-2.45	0.0003	0.0017	mmu-miR-7078-5p
-3.98	4.13E-08	2.75E-06	mmu-miR-135a-2-3p		-2.45	1.76E-06	3.36E-05	mmu-miR-7a-2-3p
-3.95	8.96E-06	0.0001	mmu-miR-7210-5p		-2.44	0.0028	0.0089	mmu-miR-7681-5p
-3.92	3.89E-09	7.68E-07	mmu-miR-6996-5p		-2.43	0.0002	0.0012	mmu-miR-7025-5p
-3.88	2.19E-08	1.90E-06	mmu-miR-7073-5p		-2.43	0.0001	0.0008	mmu-miR-7649-5p
-3.87	4.08E-07	1.26E-05	mmu-miR-7219-5p		-2.43	7.26E-06	9.71E-05	mmu-miR-6962-3p
-3.86	8.43E-05	0.0006	mmu-miR-124-3p		-2.43	0.0005	0.0025	mmu-miR-6401
-3.86	0.0011	0.0042	mmu-miR-344d-1-5p		-2.41	8.04E-06	0.0001	mmu-miR-1933-5p
-3.85	0.0002	0.0009	mmu-miR-6402		-2.4	0.0004	0.0018	mmu-miR-615-5p
-3.84	0.0003	0.0018	mmu-miR-302a-5p		-2.4	0.0009	0.0038	mmu-miR-7027-5p
-3.83	5.16E-08	2.94E-06	mmu-miR-410-5p		-2.38	0.0001	0.0008	mmu-miR-6973a-5p
-3.79	0.0006	0.0026	mmu-miR-666-5p		-2.37	0.002	0.0067	mmu-miR-6412
-3.79	0.0001	0.0008	mmu-miR-5104		-2.37	0.0009	0.0037	mmu-miR-6987-3p
-3.79	3.29E-06	5.28E-05	mmu-miR-1936		-2.36	4.89E-08	2.89E-06	mmu-miR-7037-5p
-3.72	0.0002	0.0013	mmu-miR-7000-3p		-2.36	3.60E-06	5.58E-05	mmu-miR-3105-5p
-3.72	0.003	0.0095	mmu-miR-6408		-2.36	0.0015	0.0054	mmu-miR-741-3p
-3.69	0.0012	0.0044	mmu-miR-7066-3p		-2.35	8.34E-05	0.0006	mmu-miR-200a-5p
-3.69	0.0002	0.0011	mmu-miR-5625-3p		-2.35	0.0021	0.007	mmu-miR-6965-3p
-3.65	9.86E-05	0.0007	mmu-miR-7051-5p		-2.34	3.14E-05	0.0003	mmu-miR-7018-5p
-3.64	3.83E-06	5.77E-05	mmu-miR-344f-5p		-2.34	0.0011	0.0042	mmu-miR-6926-5p
-3.64	0.0007	0.0029	mmu-miR-7235-3p		-2.33	0.0001	0.0008	mmu-miR-3081-5p
-3.57	2.86E-05	0.0003	mmu-miR-6354		-2.33	0.0002	0.0013	mmu-miR-6940-3p
-3.55	1.65E-06	3.31E-05	mmu-miR-3059-3p		-2.32	0.0002	0.0012	mmu-miR-6385
-3.54	0.0004	0.002	mmu-miR-7015-5p		-2.31	0.0018	0.0063	mmu-miR-3076-3p
-3.5	8.11E-07	2.01E-05	mmu-miR-6974-5p		-2.31	5.96E-05	0.0005	mmu-miR-7671-5p
-3.48	3.70E-06	5.63E-05	mmu-miR-3095-3p		-2.3	0.0002	0.0011	mmu-miR-6989-5p
-3.46	0.0005	0.0022	mmu-miR-29c-5p		-2.3	2.79E-05	0.0003	mmu-miR-742-3p
-3.44	5.09E-07	1.42E-05	mmu-miR-6939-5p		-2.29	5.31E-06	7.51E-05	mmu-miR-7077-3p
-3.43	3.08E-05	0.0003	mmu-miR-5133		-2.28	0.0005	0.0025	mmu-miR-7007-5p
-3.41	7.34E-09	9.76E-07	mmu-miR-767		-2.28	0.0011	0.0042	mmu-miR-6352
-3.37	9.11E-06	0.0001	mmu-miR-5616-3p		-2.28	0.0008	0.0033	mmu-miR-463-3p
-3.36	4.33E-08	2.79E-06	mmu-miR-7086-5p		-2.27	0.0005	0.0022	mmu-miR-6945-5p
-3.35	0.0003	0.0014	mmu-miR-7000-5p		-2.26	0.0004	0.0022	mmu-miR-154-5p
-3.32	0.0013	0.005	mmu-miR-7054-5p		-2.26	1.29E-07	5.51E-06	mmu-miR-1943-3p
-3.29	0.0015	0.0055	mmu-miR-3097-5p		-2.25	0.0027	0.0086	mmu-miR-7017-3p
-3.2	0.0005	0.0023	mmu-miR-7068-5p		-2.25	1.29E-06	2.85E-05	mmu-miR-551b-5p
-3.2	0.002	0.0068	mmu-miR-344d-3p		-2.24	8.97E-05	0.0006	mmu-miR-6966-5p
-3.17	4.45E-08	2.79E-06	mmu-miR-6988-3p		-2.24	0.0003	0.0014	mmu-miR-1954

-3.15	2.59E-05	0.0002	mmu-miR-181d-3p		-2.23	0.0001	0.0008	mmu-miR-6946-5p
-3.13	0.0031	0.0097	mmu-miR-16-2-3p		-2.22	1.41E-05	0.0002	mmu-miR-6960-5p
-3.1	3.88E-09	7.68E-07	mmu-miR-7017-5p		-2.21	0.0011	0.0043	mmu-miR-361-3p
-3.09	2.28E-05	0.0002	mmu-miR-6936-5p		-2.21	0.0033	0.01	mmu-miR-297b-3p
-3.08	2.14E-06	3.94E-05	mmu-miR-7094b-2-5p		-2.21	0.0033	0.01	mmu-miR-297a-3p
-3.07	1.77E-06	3.36E-05	mmu-miR-7036-3p		-2.21	0.0033	0.01	mmu-miR-297c-3p
-3.02	0.0027	0.0086	mmu-miR-6924-5p		-2.2	0.0026	0.0084	mmu-miR-5113
-3.02	0.0022	0.0074	mmu-miR-6958-3p		-2.2	1.13E-06	2.62E-05	mmu-miR-3110-3p
-3.02	5.67E-05	0.0005	mmu-miR-494-5p		-2.19	0.0005	0.0023	mmu-miR-8096
-3.01	0.0025	0.008	mmu-miR-29b-2-5p		-2.19	0.0014	0.0051	mmu-miR-5131
-3.01	3.68E-05	0.0003	mmu-miR-6901-5p		-2.19	0.0009	0.0037	mmu-miR-126b-3p
-2.98	0.0023	0.0077	mmu-miR-673-3p		-2.18	0.003	0.0094	mmu-miR-6369
-2.97	0.0006	0.0027	mmu-miR-3070a-3p		-2.17	0.0003	0.0016	mmu-miR-7001-5p
-2.92	2.02E-05	0.0002	mmu-miR-6395		-2.17	0.0009	0.0037	mmu-miR-499-5p
-2.92	2.16E-05	0.0002	mmu-miR-1932		-2.17	9.61E-08	4.45E-06	mmu-miR-7041-3p
-2.92	4.78E-05	0.0004	mmu-miR-412-3p		-2.16	0.0031	0.0098	mmu-miR-760-3p
-2.91	3.39E-06	5.36E-05	mmu-miR-5108		-2.16	0.0002	0.001	mmu-miR-7238-3p
-2.89	6.40E-08	3.47E-06	mmu-miR-3089-5p		-2.16	0.001	0.0041	mmu-let-7f-2-3p
-2.88	0.0027	0.0086	mmu-miR-8108		-2.15	0.0002	0.0014	mmu-miR-1933-3p
-2.87	0.001	0.0039	mmu-miR-103-2-5p		-2.15	6.58E-08	3.51E-06	mmu-miR-7664-3p
-2.87	2.98E-05	0.0003	mmu-miR-127-5p		-2.14	1.87E-05	0.0002	mmu-miR-7020-5p
-2.86	0.0001	0.0008	mmu-miR-1966-5p		-2.14	0.0002	0.0012	mmu-miR-6973b-5p
-2.86	0.0013	0.0048	mmu-miR-679-5p		-2.13	0.0009	0.0037	mmu-miR-6929-5p
-2.86	1.27E-06	2.81E-05	mmu-miR-490-5p		-2.13	5.59E-05	0.0005	mmu-miR-129b-5p
-2.86	0.0013	0.0049	mmu-miR-5101		-2.13	1.89E-05	0.0002	mmu-miR-7214-5p
-2.86	0.0001	0.0007	mmu-miR-1193-5p		-2.13	0.0001	0.0008	spike_in-control-44
-2.84	0.0029	0.0093	mmu-miR-7234-5p		-2.12	9.16E-07	2.23E-05	mmu-miR-339-3p
-2.84	0.0005	0.0022	mmu-miR-500-5p		-2.12	0.0008	0.0033	mmu-miR-432
-2.82	0.0002	0.0009	mmu-miR-483-3p		-2.11	0.0003	0.0014	mmu-miR-764-3p
-2.8	0.0009	0.0036	mmu-miR-485-5p		-2.09	0.0018	0.0063	mmu-miR-7119-5p
-2.78	0.0011	0.0042	mmu-miR-5114		-2.07	0.0002	0.0012	mmu-miR-6938-5p
-2.78	0.0008	0.0032	mmu-miR-6909-3p		-2.07	0.0009	0.0038	mmu-miR-1191b-3p
-2.77	3.54E-05	0.0003	mmu-miR-208a-3p		-2.07	0.0001	0.0008	mmu-miR-7243-5p
-2.77	3.96E-05	0.0004	mmu-miR-344g-3p		-2.06	1.29E-05	0.0001	mmu-miR-6346
-2.75	0.001	0.0041	mmu-miR-7117-5p		-2.06	1.57E-07	6.26E-06	mmu-miR-7218-3p
-2.75	0.0016	0.0058	mmu-miR-7647-5p		-2.06	0.0014	0.0052	mmu-miR-6926-3p
-2.74	1.25E-06	2.78E-05	mmu-miR-7062-3p		-2.04	6.05E-05	0.0005	mmu-miR-880-5p
-2.73	6.56E-05	0.0005	mmu-miR-6943-5p		-2.04	0.0003	0.0017	mmu-miR-7091-5p
-2.73	0.0023	0.0075	mmu-miR-6944-3p		-2.04	9.34E-05	0.0007	mmu-miR-6417
-2.71	1.34E-08	1.53E-06	mmu-miR-7057-5p		-2.04	0.0007	0.003	mmu-miR-449c-3p
-2.7	2.95E-05	0.0003	mmu-miR-1904		-2.04	0.0004	0.0021	mmu-miR-7688-3p
-2.7	0.0025	0.0082	mmu-miR-3099-3p		-2.03	0.0004	0.0021	mmu-miR-1940
-2.69	2.07E-05	0.0002	mmu-miR-6955-3p		-2.03	0.0008	0.0034	mmu-miR-6977-3p
-2.68	3.89E-06	5.83E-05	mmu-miR-466h-3p		-2.03	6.28E-05	0.0005	mmu-miR-6372
-2.67	0.0008	0.0033	mmu-miR-383-3p		-2.03	2.86E-05	0.0003	mmu-miR-6974-3p
-2.65	0.0009	0.0036	mmu-miR-3058-3p		-2.03	0.0002	0.001	mmu-miR-7029-5p
-2.64	2.10E-08	1.90E-06	mmu-miR-7679-5p		-2.02	0.0005	0.0023	mmu-miR-7088-5p
-2.63	0.0007	0.0032	mmu-miR-7647-3p		-2.02	0.0006	0.0027	mmu-miR-7052-5p
-2.63	1.06E-05	0.0001	mmu-miR-743b-5p		-2.02	0.0001	0.0008	mmu-miR-292-3p
-2.62	6.94E-05	0.0005	mmu-miR-200c-5p		-2.01	0.0014	0.0051	mmu-miR-6941-3p
-2.6	0.0001	0.0009	mmu-miR-3086-3p		-2	1.76E-05	0.0002	mmu-miR-365-2-5p
-2.59	0.0029	0.0093	mmu-miR-450a-2-3p		-2	0.0006	0.0029	mmu-miR-7066-5p
-2.58	0.0004	0.0019	mmu-miR-3070b-3p					

Após a identificação do microRNAs diferencialmente expressos, nós verificamos os possíveis processos biológicos associados à eles. Para isso, nós realizamos uma série de análises

de bioinformática através do miRNet (<https://www.mirnet.ca/>). O miRNet gera os resultados através da interação entre os microRNAs inseridos na plataforma e os seus genes alvos validados e preditos. Primeiramente, nós realizamos as análises utilizando o *hypergeometric test*, o qual usa a distribuição hipergeométrica para mensurar a significância estatística dos genes alvos identificados. A **Figura 17A-17E** mostra os resultados encontrados.

Figura 17. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A-B:** As 15 vias de sinalização mais enriquecidas no Kegg e Reactome com uma significância definida

por um valor de $p < 0.05$. **C:** Componentes celulares enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **D:** Funções moleculares enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **E:** Os 15 processos biológicos mais enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*.

Na sequência, nós realizamos as análises utilizando o *Unbiased Empirical test*, o qual estima a distribuição nula dos genes alvos a partir dos microRNAs inseridos na plataforma. O *Unbiased Empirical test* é dividido em 4 etapas: 1) Uma lista de microRNAs de mesmo tamanho é selecionada aleatoriamente a partir de todos os microRNAs com alvos conhecidos no banco de dados; 2) As anotações funcionais (por exemplo Kegg - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, ou Reactome) são então executadas; 3) O processo é repetido 1000 vezes (padrão); 4) A comparação dos *hits* em cada análise (por exemplo Kegg ou Reactome) e os valores empíricos de p (Emp. P) são calculados como a proporção de sobreposições de 1000 processos aleatórios que são iguais ou maiores que os valores originais. A **Figura 18A-18B** mostra os resultados encontrados.

Figura 18. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **B:** As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*.

Por fim, através do miRNet, nós verificamos quais dos microRNAs diferencialmente expressos e quais de seus genes alvos e preditos estão mais enriquecidos na interação entre eles. Para determinar os microRNAs e genes mais enriquecidos, o miRNet calcula o “*Betweenness*”

(mensura o número de caminhos mais curtos que passam pelo “*node*”). O “*betweenness*” leva em consideração a estrutura de rede global. Por exemplo, os “*node*” que ocorrem entre dois “*nodes*” densos terão uma centralidade de alta interjunção, mesmo que seus valores de centralidade de grau não sejam altos). Além do “*betweenness*”, o “*Degree*” também é calculado (O grau de um “*node*” é o número de conexões que ele apresenta com outros “*nodes*”. “*Nodes*” com maior grau de “*node*” atuam como hubs em uma rede). A **Figura 19A-19B** mostra os resultados encontrados.

Figura 19. Análise de *Network Enrichment* envolvendo os microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** microRNAs mais enriquecidos na *network*. **B:** Genes alvos e preditos dos microRNAs mais enriquecidos na *network*.

Visando transpor os resultados encontrados para pacientes com câncer de cólon, nós verificamos quais dos microRNAs diferencialmente expressos que apresentam homologia com humanos. Para essas condições, foram encontrados 16 microRNAs diferencialmente expressos (**Tabela 3**).

Tabela 3. Lista de microRNAs diferencialmente expressos que apresentam homologia com humanos selecionados a partir de um *fold change* > 2 ou < -2; com um valor de $p < 0.05$ e com um FDR < 0.01 no tumor CT26 de camundongos sedentários e treinados após 19 dias da injeção das células tumorais.

Fold Change	P-val	FDR P-val	Transcript ID(Array Design)	Homologia com humano?	Human name
-4.1	2.02E-08	1.90E-06	mmu-miR-491-5p	sim	hsa-miR-491-5p
-3.83	5.16E-08	2.94E-06	mmu-miR-410-5p	sim	hsa-miR-410-5p
-2.86	1.27E-06	2.81E-05	mmu-miR-490-5p	sim	hsa-miR-490-5p
-3.55	1.65E-06	3.31E-05	mmu-miR-3059-3p	sim	hsa-miR-3059-3p
-2.77	3.54E-05	0.0003	mmu-miR-208a-3p	sim	hsa-miR-208a-3p
-2.87	2.98E-05	0.0003	mmu-miR-127-5p	sim	hsa-miR-127-5p
-2.62	6.94E-05	0.0005	mmu-miR-200c-5p	sim	hsa-miR-200c-5p
-2.35	8.34E-05	0.0006	mmu-miR-200a-5p	sim	hsa-miR-200a-5p
-2.4	0.0004	0.0018	mmu-miR-615-5p	sim	hsa-miR-615-5p
-2.26	0.0004	0.0022	mmu-miR-154-5p	sim	hsa-miR-154-5p
-3.46	0.0005	0.0022	mmu-miR-29c-5p	sim	hsa-miR-29c-5p
-2.8	0.0009	0.0036	mmu-miR-485-5p	sim	hsa-miR-485-5p
-2.17	0.0009	0.0037	mmu-miR-499-5p	sim	hsa-miR-499a-5p
-2.87	0.001	0.0039	mmu-miR-103-2-5p	sim	hsa-miR-103a-2-5p
-4.44	0.0031	0.0096	mmu-miR-154-3p	sim	hsa-miR-154-3p
-2.16	0.0031	0.0098	mmu-miR-760-3p	sim	hsa-miR-760

Na sequência, nós avaliamos os possíveis processos biológicos associados com os microRNAs diferencialmente expressos que apresentam homologia com humanos. Primeiramente, nós realizamos as análises utilizando o *hypergeometric test*. A **Figura 20A-20D** mostra os resultados encontrados.

Figura 20. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos, com homologia com humanos, nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **B:** As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **C:** Os processos biológicos enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **D:** Componentes celulares enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*.

Na sequência, nós realizamos as análises utilizando o *Unbiased Empirical test* para os microRNAs diferencialmente expressos que apresentam homologia com humanos. A **Figura 21A-21B** mostra os resultados encontrados.

Figura 21. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **B:** As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*.

Como o volume tumoral pode ser um fator de confusão para a identificação dos microRNAs diferencialmente expressos, nós realizamos uma análise de “*Real Covariate*”, a qual corrige os resultados a partir do volume tumoral, para identificar de maneira mais fidedigna os microRNAs alterados pelo treinamento físico. A partir dessa análise, nós encontramos 37 microRNAs diferencialmente expressos (**Tabela 4**).

Tabela 4. Lista de microRNAs diferencialmente expressos, ajustados pelo volume tumoral (“*Real Covariate*”), com um *fold change* > 2 ou < -2; com um valor de p < 0.05 e com um FDR < 0.01 no tumor CT26 de camundongos sedentários e treinados após 19 dias da injeção das células tumorais.

Fold Change	P-val	FDR P-val	Transcript ID(Array Design)		Fold Change	P-val	FDR P-val	Transcript ID(Array Design)
-2.71	2.51E-07	6.18E-05	mmu-miR-7057-5p		-2.36	0.0001	0.002	mmu-miR-3105-5p
-3.92	8.68E-07	0.0001	mmu-miR-6996-5p		-2.77	0.0001	0.0021	mmu-miR-208a-3p
-3.1	1.14E-06	0.0002	mmu-miR-7017-5p		-2.43	0.0001	0.0022	mmu-miR-6962-3p
-2.89	1.52E-06	0.0002	mmu-miR-3089-5p		-3.08	0.0001	0.0023	mmu-miR-7094b-2-5p
-3.17	1.75E-06	0.0002	mmu-miR-6988-3p		-3.55	0.0001	0.0024	mmu-miR-3059-3p
-3.41	2.05E-06	0.0002	mmu-miR-767		-2.11	0.0001	0.0024	mmu-miR-764-3p
-4.1	4.21E-06	0.0003	mmu-miR-491-5p		-2.2	0.0002	0.0026	mmu-miR-3110-3p
-2.64	4.44E-06	0.0003	mmu-miR-7679-5p		-3.07	0.0002	0.0027	mmu-miR-7036-3p
-3.36	5.02E-06	0.0003	mmu-miR-7086-5p		-3.48	0.0002	0.0028	mmu-miR-3095-3p
-3.88	5.62E-06	0.0003	mmu-miR-7073-5p		-2.51	0.0002	0.0028	mmu-miR-7679-3p
-2.36	5.74E-06	0.0003	mmu-miR-7037-5p		-2.54	0.0002	0.0029	mmu-miR-664-5p
-3.98	8.98E-06	0.0004	mmu-miR-135a-2-3p		-2.86	0.0002	0.0031	mmu-miR-490-5p
-4.33	1.04E-05	0.0005	mmu-miR-7223-5p		-2.43	0.0002	0.0032	mmu-miR-7025-5p
-3.83	1.02E-05	0.0005	mmu-miR-410-5p		-2.74	0.0002	0.0032	mmu-miR-7062-3p
-2.15	1.22E-05	0.0005	mmu-miR-7664-3p		-2.37	0.0003	0.0034	mmu-miR-6412
-5.17	1.44E-05	0.0005	mmu-miR-299a-3p		-3.65	0.0004	0.0051	mmu-miR-7051-5p
-3.86	1.54E-05	0.0006	mmu-miR-124-3p		-2.67	0.0005	0.0054	mmu-miR-383-3p
-4.16	1.94E-05	0.0007	mmu-miR-7226-5p		-2.03	0.0005	0.0058	mmu-miR-6372
-2.17	1.98E-05	0.0007	mmu-miR-7041-3p		-2.41	0.0005	0.006	mmu-miR-1933-5p
-2.06	2.10E-05	0.0007	mmu-miR-7218-3p		-3.79	0.0006	0.0062	mmu-miR-1936
-2.77	2.86E-05	0.0009	mmu-miR-344g-3p		-2.91	0.0006	0.0063	mmu-miR-5108
-2.26	2.84E-05	0.0009	mmu-miR-1943-3p		-2.04	0.0006	0.0064	mmu-miR-6417
-2.04	2.81E-05	0.0009	mmu-miR-7091-5p		-2.82	0.0006	0.0065	mmu-miR-483-3p
-5.28	3.37E-05	0.001	mmu-miR-6927-5p		-2.29	0.0006	0.0065	mmu-miR-7077-3p
-2.49	4.13E-05	0.0011	mmu-miR-7222-5p		-2.68	0.0007	0.0068	mmu-miR-466h-3p
-2.25	4.47E-05	0.0012	mmu-miR-551b-5p		-2.22	0.0007	0.0071	mmu-miR-6960-5p
-3.87	5.61E-05	0.0013	mmu-miR-7219-5p		-2.03	0.0008	0.0074	mmu-miR-6977-3p
-2.45	6.03E-05	0.0014	mmu-miR-7a-2-3p		-3.95	0.0008	0.0077	mmu-miR-7210-5p
-3.15	6.29E-05	0.0014	mmu-miR-181d-3p		-2.92	0.0008	0.008	mmu-miR-1932
-3.64	6.87E-05	0.0015	mmu-miR-344f-5p		-2.16	0.0009	0.0083	mmu-miR-7238-3p
-2.12	6.85E-05	0.0015	mmu-miR-339-3p		-2.57	0.0009	0.0084	mmu-miR-6905-5p
-3.44	7.17E-05	0.0015	mmu-miR-6939-5p		-2.92	0.0009	0.0085	mmu-miR-6395
-2.49	8.98E-05	0.0017	mmu-miR-6361		-2.04	0.001	0.0089	mmu-miR-880-5p
-5.01	9.71E-05	0.0018	mmu-miR-6962-5p		-2.13	0.001	0.009	mmu-miR-7214-5p
-2.23	9.69E-05	0.0018	mmu-miR-6946-5p		-7.16	0.0011	0.0094	mmu-miR-470-5p
-3.5	0.0001	0.0019	mmu-miR-6974-5p		-3.35	0.0011	0.0096	mmu-miR-7000-5p
					-4.46	0.0011	0.0098	mmu-miR-760-5p

A partir desses 37 microRNAs diferencialmente expressos, nós analisamos os possíveis processos biológicos associados a eles e quais desses microRNAs diferencialmente expressos e quais de seus genes alvos e preditos estariam mais enriquecidos nessa interação. As **Figuras 22A-22C e 23A-23B** mostram os resultados encontrados.

Figura 22. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos, ajustado pelo volume tumoral, nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. **B:** As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para as análises, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. **C:** As 20 vias de sinalização mais enriquecidas no Reactome com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*.

Figura 23. Análise de *Network Enrichment* envolvendo os microRNAs diferencialmente expressos, ajustados pelo volume tumoral, nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** microRNAs mais enriquecidos na *network*. **B:** Genes alvos e preditos dos microRNAs mais enriquecidos na *network*.

Por fim, nós verificamos quais dos 37 microRNAs diferencialmente expressos, ajustados pelo volume tumoral, apresentam homologia com humanos. Dos 37 microRNAs, nós encontramos 5 microRNAs que apresentam homologia com humanos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Lista de microRNAs diferencialmente expressos, ajustados pelo volume tumoral, que apresentam homologia com humanos e selecionados a partir de um *fold change* > 2 ou < -2; com um valor de p < 0.05 e com um FDR < 0.01 no tumor CT26 de camundongos sedentários e treinados após 19 dias da injeção das células tumorais.

Fold Change	P-val	FDR P-val	Transcript ID(Array Design)	Homologia com humanos?	Human name
-4.1	4.21E-06	0.0003	mmu-miR-491-5p	sim	hsa-miR-491-5p
-3.83	1.02E-05	0.0005	mmu-miR-410-5p	sim	hsa-miR-410-5p
-2.77	0.0001	0.0021	mmu-miR-208a-3p	sim	hsa-miR-208a-3p
-3.55	0.0001	0.0024	mmu-miR-3059-3p	sim	hsa-miR-3059-3p
-2.86	0.0002	0.0031	mmu-miR-490-5p	sim	hsa-miR-490-5p

A partir desses 5 microRNAs, nós verificamos os processos biológicos associados a eles. A **Figura 24A-24D** mostra os resultados encontrados.

Figura 24. miRNet análise dos microRNAs diferencialmente expressos, ajustado pelo volume tumoral e com homologia com humanos, nos tumores CT26 de camundongos treinados. **A:** As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. **B:** As vias de sinalização enriquecidas no Kegg com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*. **C:** Os processos biológicos enriquecidos no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *hypergeometric test*. **D:** As funções moleculares enriquecidas no Gene Ontology com uma significância definida por um valor de $p < 0.05$. Para a análise, o algoritmo utilizado foi o *Unbiased Empirical test*.

Na sequência, nós avaliamos se existiriam microRNAs diferencialmente expressos em comum entre os microRNAs encontrados pela análise convencional e os microRNAs encontrados pela análise de “*Real Covariate*” (ajustada pelo volume tumoral). Observa-se que todos os microRNAs diferencialmente expressos encontrados pela análise de “*Real Covariate*” também foram encontrados na análise convencional (**Figura 25A-25B**).

Figura 25. Interação entre as análises de microRNA array convencional e ajustada pelo volume tumoral. **A:** Diagrama de Venn mostrando os microRNAs diferencialmente expressos em comum entre as análises de microRNA array convencional e ajustada pelo volume tumoral. **B:** Diagrama de Venn mostrando os microRNAs diferencialmente expressos, com homologia para humanos, em comum entre as análises de microRNA array convencional e ajustada pelo volume tumoral.

Para verificar se de fato o treinamento físico reduz a expressão dos microRNAs nos tumores CT26, nós analisamos por RT-qPCR a expressão de uma série de microRNAs nas amostras que foram utilizadas no ensaio de microRNA *array* (mais as amostras desse mesmo grupo de camundongos que não foram utilizadas no ensaio de microRNA *array*) (**Figura 26A**) bem como em amostras de outro grupo de camundongos que sofreram o mesmo protocolo experimental de treinamento físico (**Figura 26B**). Nesse segundo grupo de amostras analisadas, o treinamento físico também reduziu o crescimento tumoral CT26 (Tobias *et al.* **dados ainda não publicados**). Dos 16 microRNAs testados, o treinamento físico reduziu significativamente a expressão de 7 desses microRNAs, sendo que os outros 9 microRNAs não apresentaram diferença entre os tumores dos camundongos sedentários e treinados (**Figura 26A**). Além disso, quando nós selecionamos aleatoriamente 2 dos 7 microRNAs diferencialmente expressos entre os grupos sedentários e treinados, os microRNAs-335-5p e -542-3p, para serem analisados em outro grupo de amostras, o mesmo padrão foi observado, ou seja, o treinamento físico reduziu a expressão desses microRNAs (**Figura 26B**). Para determinar se o treinamento físico promoveria resultado semelhantes nos tumores CT26 dos camundongos imunodeficientes NUDE, nós selecionamos o microRNA mais responsivo ao treinamento, o microRNA-103-2-5p. Interessantemente, nos tumores CT26 crescidos nos camundongos NUDE, o treinamento

físico promoveu um aumento da expressão do microRNA-103-2-5p em comparação aos tumores dos camundongos sedentários (**Figura 26C**). Quando analisada a expressão do microRNA-103-2-5p nas células CT26 primárias “sedentárias” e “treinadas”, nós não observamos diferença entre os grupos (**Figura 26D**). Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento físico reduz globalmente a expressão do microRNAs nos tumores CT26 em camundongos imunocompetentes.

Figura 26: Treinamento físico reduz globalmente a expressão dos microRNAs no tumor CT26. **A-D:** Análise de RT-qPCR para validação dos microRNAs encontrados diferencialmente expressos no microRNA array em diferentes condições experimentais. Os gráficos de volume tumoral indicam a origem das amostras analisadas. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e ANOVA de um fator. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.10 Treinamento físico reduz a expressão gênica de Dicer e Xpo5 nos tumores e nas células CT26 primárias

Uma vez que o treinamento físico reduziu a expressão de 6,6% dos microRNAs analisados no microRNA array (**Figura 16A-16C**), sem aumentar a expressão de nenhum microRNA, nós nos perguntamos se o treinamento físico não poderia estar influenciando o processo de biogênese dos microRNAs. Para isso, nós avaliamos a expressão gênica de marcadores associados a biogênese de microRNAs nas diferentes condições experimentais. Primeiramente, no grupo de amostras que foram utilizadas no ensaio de microRNA array, nós observamos que o tumor CT26 apresenta um aumento de expressão de vários desses marcadores em comparação ao cólon saudável (**Figura 27A**). Importante, nós observamos que o treinamento físico reduziu a expressão de Dicer e Xpo5 em comparação aos tumores CT26 dos animais sedentários (**Figura 27A**). Entretanto, quando analisada a expressão gênica de Dicer, Xpo5 e Drosha nas nossas outras condições experimentais, nós não observamos diferenças entre os grupos (**Figura 27B-27J**). Similar ao resultado encontrado para a expressão do micro-103-2-5p nos tumores dos camundongos imunodeficientes NUDE (**Figura 26C**), também houve um aumento de expressão gênica de Xpo5, Dicer e Drosha nos tumores dos camundongos treinados (**Figura 27G**), sugerindo que os mecanismos envolvidos na redução do crescimento tumoral nos camundongos imunodeficientes são diferentes aos encontrados nos camundongos imunocompetentes.

Para confirmar que de fato existe um aumento de expressão desses genes relacionados à biogênese de microRNAs nos tumores CT26 em comparação ao cólon saudável, nós avaliamos a expressão gênica desses marcadores utilizando o sequenciamento de RNA realizado por Castle *et al.* (2014) (CASTLE *et al.*, 2014). Os tumores CT26 apresentam um aumento de expressão gênica para todos os marcadores analisados em comparação ao cólon saudável (**Figura 26K**), resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo.

Figura 27. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta de marcadores de biogênese de microRNAs no tumor CT26. **A-J:** Análise de RT-qPCR para marcadores relacionados à biogênese de microRNAs nos tumores

nos tumores CT26 em diferentes condições experimentais. Os gráficos de volume tumoral indicam a origem das amostras analisadas. **K:** Análise de sequenciamento de RNA dos tumores CT26. Dados obtidos de Castle et al., 2014 (CASTLE et al., 2014). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal e ANOVA de um fator. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

Paralelamente, nós também analisamos a expressão gênica de uma série de marcadores associados ao desenvolvimento, crescimento e agressividade do câncer colorretal. Nós observamos que o treinamento físico reduziu a expressão de Vegfa, Hif1 α e Il8rb (*Chemokine (C-X-C motif) receptor 2*) (**Figuras 28**), marcadores associados à invasão, metástase e proliferação das células tumorais (VALERI et al., 2014a). Além disso, nós observamos que o treinamento físico aumentou a expressão de p53 (**Figura 28**), um bem estabelecido gene supressor tumoral.

Figura 28: Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta de marcadores de desenvolvimento, crescimento e agressividade do câncer colorretal. Análise de RT-qPCR. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA de um fator. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

Uma vez que houve uma grande variabilidade na expressão dos genes testados nos tumores CT26 em todas as nossas condições experimentais (**Figura 27**), nós analisamos conjuntamente os dados de expressão gênica para Xpo5, Dicer e Drosha nos tumores CT26 crescidos nos camundongos imunocompetentes Balb/c para verificar se uma possível redução na dispersão dos dados nos forneceria um resultado mais consistente. Com isso, foi observado que o treinamento reduziu significativamente a expressão gênica de Dicer (**Figura 29A**) enquanto que Drosha (**Figura 29B**) e Xpo5 (**Figura 29C**) não foram alteradas.

Por fim, nós avaliamos se esses genes alterados pelo treinamento físico nos tumores dos camundongos, principalmente os genes envolvidos com o processo de biogênese de microRNAs, estariam alterados especificamente nas células tumorais CT26 primárias geradas nas nossas diferentes condições experimentais. Nas células CT26 primárias geradas a partir dos tumores c2SED+CT26 e c2TR+CT26, houve uma redução da expressão gênica de Ago2 (*Argonaute RISC catalytic subunit 2*), Drosha, Xpo5, PACT (*Protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator*) e P53 nas células CT26 “treinadas” em comparação as células CT26 “sedentárias” (**Figura 29D**). Contudo, quando analisado a expressão gênica de Xpo5, Dicer e Drosha nas células CT26 primárias geradas individualmente a partir dos tumores dos camundongos sedentários e treinados, não houve diferença entre os grupos (**Figura 29E**). Entretanto, quando as células CT26 primárias geradas a partir dos tumores tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26 foram injetadas em novos camundongos sedentários, houve uma redução da expressão gênica de Xpo5 e Dicer nas células CT26 treinadas em comparação às células CT26 sedentárias (**Figura 29F**). Juntos, esses resultados sugerem que a redução dos microRNAs induzida pelo treinamento físico está associada com a redução de expressão gênica de marcadores essenciais para o processo de biogênese dos microRNAs, mais especificamente, Dicer e Xpo5 tanto no tumor quanto nas células tumorais e que essas respostas persistem ao longo do tempo.

Figura 29: Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta de marcadores de biogênese de microRNAs no tumor CT26 e nas células CT26 primárias. **A-C:** Análise de RT-qPCR para Dicer, Drosha e Xpo5. As amostras de tumores CT26 de todas as nossas condições experimentais em camundongos Balb/c foram analisadas juntas. **D:** Análise de RT-qPCR das células tumorais primárias originadas dos tumores c1SED+CT26 e c1TR+CT26 (células c2SED+CT26 e c2TR+CT26). **E:** Análise de RT-qPCR das células tumorais primárias originadas dos tumores

SED+CT26 e TR+CT26 (células tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26). **F:** Análise de RT-qPCR das células tumorais primárias originadas dos tumores tc1SED+CT26 e tc1TR+CT26 (células tc2SED+CT26 e tc2TR+CT26). Os gráficos de volume tumoral indicam a origem tumoral na qual as células CT26 primárias foram geradas. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

4.11 Marcadores de processamento de microRNAs estão alterados em pacientes com câncer de cólon

Para entender se os genes e as proteínas associados ao processamento de microRNAs estariam alterados em amostras humanas de tumores primários de câncer de cólon, nós utilizamos os dados do “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA – genes) e *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC – proteínas) para comparar a expressão gênica e proteica entre os tumores de cólon e o cólon saudável. Dos marcadores que possuíam os dados de expressão gênica (TCGA) e de expressão proteica (CPTAC) disponíveis para as análises, DICER foi o único marcador que não apresentou alteração em sua expressão gênica (**Figuras 30A**) embora tenha apresentado redução de sua expressão proteica (**Figuras 30B**). Para XPO5 (**Figuras 30C-30D**) e PACT (PRKRA) (**Figuras 30G-30H**) houve aumento tanto da expressão gênica quanto da expressão proteica em comparação ao cólon saudável. DGCR8 (*DGCR8 microprocessor complex subunit*) apresentou apenas aumento da expressão gênica sem alterar sua expressão proteica (**Figuras 30E-30F**), ao passo que para AGO2 (EIF2C2) apresentou um aumento de sua expressão gênica (**Figuras 30I**) e redução da expressão proteica (**Figuras 30J**). TRBP (TARBP2) (*TARBP2 subunit of RISC loading complex*) e DROSHA (RNASEN) apresentaram aumento da expressão gênica (**Figuras 30K-30L**) sem ser identificado expressão proteica para ambas.

Figura 30. Expressão gênica e proteica de marcadores de biogênese de microRNAs em pacientes com câncer de cólon do “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA – genes) e “*Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium*” (CPTAC – proteínas). **A-B:** Expressão gênica e proteica de DICER1. **C-D:** Expressão gênica e proteica de XPO5. **E-F:** Expressão gênica e proteica de DGCR8. **G-H:** Expressão gênica e proteica de PACT (PRKRA). **I-J:** Expressão gênica e proteica de AGO2 (EIF2C2). **K:** Expressão gênica de TRBP (TARBP2). **L:** Expressão gênica de DROSHA (RNASEN). Resultados gerados através da plataforma UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) (CHANDRASHEKAR et al., 2017).

4.12 Dicer está associada com a sobrevida do paciente com câncer de cólon em diferentes coorte

Por fim, nós verificamos a expressão gênica de DICER, XPO5 e DROSHA no tumor de cólon estaria associada com a sobrevida dos pacientes. Utilizando 3 diferentes coortes de pacientes, nós observamos que quanto menor a expressão de DICER, maior a sobrevida dos pacientes nas 3 coortes de pacientes analisadas (**Figuras 31A, 31D, 30G**), enquanto que para XPO5 foi encontrada correlação similar em apenas 1 das 3 coortes estudadas (**Figuras 31B, 31E, 30H**). Já para DROSHA, quanto maior a sua expressão nos tumores, maior a sobrevida dos

pacientes, resultado encontrado em duas das coortes de pacientes, enquanto que na outra coorte foi encontrado resultado inverso (**Figuras 31C, 31F, 30I**). Embora a expressão gênica de DICER não esteja aumentada, e a expressão proteica esteja diminuída em comparação ao cólon saudável, sua expressão gênica está correlacionada com a sobrevida dos pacientes com câncer de cólon. Juntos, todos esses resultados demonstram que o treinamento físico é capaz de reduzir o crescimento tumoral e a metástase do câncer de cólon pela redução global dos microRNAs induzida pela redução da expressão gênica de Dicer e, em menor magnitude, de Xpo5.

Figura 31: Dicer1 determina sobrevida do paciente com câncer de cólon. **A, D e G:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão DICER1 (vermelho) e baixa expressão de DICER1 (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se os seguintes dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>), “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>), e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rna – u133p2” (<http://r2.amc.nl>), respectivamente. **B, E e H:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão XPO5 (vermelho) e baixa expressão de XPO5 (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se os seguintes dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>), “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>), e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rna – u133p2” (<http://r2.amc.nl>), respectivamente. **C, F e I:** Sobrevida global de pacientes com câncer de cólon com alta expressão DROSHA

(vermelho) e baixa expressão de DROSHA (azul). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se os seguintes dataset “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073” (<http://r2.amc.nl>), “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p” (<http://r2.amc.nl>), e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rma – u133p2” (<http://r2.amc.nl>), respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos do treinamento físico, como tratamento não farmacológico, para pacientes com câncer mostram-se eficiente em diminuir os sintomas causados tanto pela doença quanto pelos tratamentos de primeira escolha. Além disso, a literatura demonstra os benefícios da atividade física para a diminuição do risco de incidência de diversos tipos de câncer (MOORE et al., 2016b). Moore *et al.* (2016) demonstraram que a prática regular de atividade física resultou na redução da incidência de 13 tipos de câncer em 26 analisados em 1,44 milhões de adultos (MOORE et al., 2016b). Diante destes resultados, é notório a capacidade que a atividade física tem em reduzir o ônus para os órgãos de saúde pública, uma vez que o risco de incidência de câncer pode vir a diminuir, além do seu importante papel em diminuir os efeitos colaterais decorrentes do tratamento medicamentoso. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nessa resposta.

Recentemente, as atenções de diversas áreas da comunidade científica se voltaram para uma nova classe de reguladores de expressão gênica: os microRNAs, que se têm mostrado como importantes fatores da regulação gênica em diferentes processos celulares, como na tumorigênese do câncer. Até o momento, apenas dois estudos avaliaram os efeitos do treinamento físico aeróbico na modulação dos microRNAs descompensados no tumor. Assim, este é um campo de estudo transcriptômico ainda incipiente e altamente promissor como terapia. Neste sentido, a identificação de microRNAs diferencialmente expressos no tumor de animais sedentários em comparação à animais treinados pode levar a identificação de microRNAs com potencial terapêutico.

Aqui, nós demonstramos que o treinamento físico reduziu o crescimento tumoral do câncer de cólon CT26 e MC38. Resultados semelhantes já foram demonstrados em diferentes modelos de câncer (BETOF et al., 2015; GOH et al., 2013; HIGGINS et al., 2014; HOJMAN et al., 2014; JU et al., 2008; MICHNA et al., 2006; ROEBUCK; MCCAFFREY; BAUMGARTNER, 1990; WOLFF et al., 2014). Recentemente, Dethlefsen *et al.* (2017) demonstraram que a incubação de células tumorais de câncer de mama com o soro de pacientes

com câncer coletado imediatamente após uma sessão aguda de exercício físico aeróbio reduziu o crescimento tumoral quando essas células foram injetadas em animais imunodeprimidos (DETHLEFSEN et al., 2017; DEVIN et al., 2019). Esses estudos sugerem que os efeitos do treinamento físico sobre o crescimento tumoral seriam em decorrência dos efeitos agudos da sessão de exercício físico (DETHLEFSEN et al., 2017; DEVIN et al., 2019; PEDERSEN et al., 2016). Entretanto, Pedersen *et al.* (2016) demonstraram que camundongos que realizaram atividade física voluntária apenas antes da injeção das células tumorais B16 durante 4 semanas apresentaram redução do crescimento tumoral semelhante aos camundongos que realizaram atividade física voluntária antes e após a injeção das células tumorais, sugerindo que os efeitos do treinamento físico podem ser independentes dos efeitos agudos das sessões de exercício após a injeção das células tumorais. Ao nosso conhecimento, o nosso estudo é o primeiro a realizar a estratégia de enxertar o fragmento tumoral de animais sedentários e treinados em novos animais saudáveis sedentários, e, também, de gerar células tumorais primárias provenientes dos tumores de animais sedentários e treinados, injetando em novos animais saudáveis sedentários. Além disso, nós demonstramos que o enxerto tumoral e a injeção das células tumorais provenientes dos animais treinados promoveram uma redução do crescimento tumoral. Como o enxerto tumoral e a injeção das células tumorais primárias foram em animais sedentários, nossos resultados sugerem que o treinamento físico gera alterações persistentes nas células tumorais e que essa resposta permanece sem os efeitos agudos e crônicos do treinamento físico no organismo, uma vez que os animais não realizaram treinamento físico em nenhum momento do protocolo experimental.

O câncer é considerado uma doença tipicamente genética; entretanto, as modificações epigenéticas apresentam um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer (FLAVAHAN; GASKELL; BERNSTEIN, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MURTHA; ESTELLER, 2016; NEBBIOSO et al., 2018). O termo “epigenética” foi originalmente descrito por Conrad Waddington para descrever mudanças hereditárias em um fenótipo celular que é independentemente de mudanças na sequência de DNA (*Deoxyribonucleic acid*) (BERGER et al., 2009). Modificações epigenéticas refletem uma complexidade de fatores que determinam a condensação do estado da cromatina, a qual determina se o DNA é acessível para as proteínas que controlam a transcrição gênica. Um estado da cromatina “relaxado” ou “aberto” da cromatina permite a transcrição gênica, enquanto que uma condição condensada ou “fechada” da cromatina impede a transcrição gênica

(ALDERTON, 2017; BARDHAN; LIU, 2013; BERGER et al., 2009; FLAVAHAN; GASKELL; BERNSTEIN, 2017; MUÑOZ-PINEDO et al., 2013; NEBBIOSO et al., 2018). A expressão dos microRNAs é regulada através de vários mecanismos, incluindo as alterações epigenéticas. Os resultados demonstrados aqui com o enxerto tumoral e injeção das células tumorais primárias sugerem que o treinamento físico promoveu essas modificações epigenéticas nas células tumorais. Cabe ressaltar que do momento que foi enxertado o primeiro fragmento tumoral até a segunda geração das células tumorais primárias, passaram-se, aproximadamente, 60 dias. Além disso, o fato dos camundongos que receberam o enxerto tumoral treinado e as células tumorais treinadas reforça a hipótese de que o treinamento físico promoveu modificações epigenéticas nas células tumorais.

Nosso estudo é o primeiro a realizar uma análise de larga escala para identificar os microRNAs diferencialmente expressos entre tumores de animais sedentários e treinados. Como resposta, nós identificamos que o treinamento físico foi capaz de reduzir a expressão de 211 microRNA. Para os critérios de seleção adotados, nós não encontramos nenhum microRNA aumentado pelo treinamento físico.

Muitos estudos demonstram o papel específico de certos microRNAs sobre a progressão tumoral (BU et al., 2013, 2016; VALERI et al., 2014b). Entretanto, recentemente, os estudos têm demonstrado que o processo de biogênese dos microRNAs está alterado no tumor e que esse fenômeno é determinante para a desregulação global dos microRNAs observada no microambiente tumoral (HU et al., 2016b; SUN et al., 2016). Aqui, nós encontramos que o treinamento físico reduziu a expressão de Dicer e Xpo5 no tumor, dois marcadores essenciais para a biogênese dos microRNAs. Além disso, nós encontramos que a expressão de Dicer e, em menor escala, Xpo5 permaneceram reduzidas também nas células tumorais treinadas. Ainda, a diminuição da expressão da DICER, pelo menos em parte, pode estar sendo contrabalançada pelo aumento da expressão de Ago2.

A influência dos níveis de expressão de Dicer sobre os processos de tumorigênese e prognóstico do paciente com câncer parecem estar associados ao perfil de expressão dos microRNAs que cada tipo e subtipo de câncer apresentam (DAVALOS; ESTELLER, 2012). Para o câncer de cólon, muitos estudos tem demonstrado que níveis elevados de expressão gênica de Dicer favorecem o crescimento da massa tumoral e um pior prognóstico do paciente. Chen *et al.* (2017) demonstraram que o nocaute de Dicer1 nas células tumorais do câncer de cólon humano HCT116 reduziu o crescimento tumoral em comparação as células HCT116

controle (CHEN et al., 2017). Além disso, o nocaute de Dicer1 promoveu a quimio-sensibilidade ao tratamento com 5-fluorouracil (CHEN et al., 2017). Por fim, os autores demonstraram que quando maior os níveis de expressão de Dicer no tumor de pacientes com câncer de cólon, maior foi a quimio-resistência desses pacientes ao tratamento com 5-fluorouracil (CHEN et al., 2017). Seguindo a mesma linha, Faber *et al.* (2011) demonstram que em uma coorte de 237 pacientes com câncer de cólon (amostras coletadas na Ludwig–Maximilians-Universität München), quando maior os níveis de expressão de Dicer no tumor, menor a sobrevida do paciente (FABER et al., 2011). Resultados semelhantes também foram encontrados por Vincenzi *et al.* (2013) (VINCENZI et al., 2013a) em outra coorte de pacientes com câncer de cólon. Embora não tenha sido observado nenhuma associação entre os níveis de Dicer e a sobrevida daqueles pacientes que não receberam tratamento com bevacizumabe, em pacientes tratados com bevacizumabe, baixos níveis de Dicer foram associados com uma maior sobrevida do paciente (VINCENZI et al., 2013b). Já Stratmann *et al.* (2011) não encontraram associação entre os níveis de expressão de Dicer no tumor de cólon com a sobrevida do paciente (STRATMANN et al., 2011). Entretanto, para esses mesmo pacientes, quando menor os níveis de Dicer no cólon adjacente saudável, maior a sobrevida do paciente (STRATMANN et al., 2011). Simmer *et al.* (2015) também não encontraram associação significativa entre os níveis de expressão de Dicer e a sobrevida de pacientes com câncer de cólon em uma coorte de 243 pacientes tratados com capecitabina em monoterapia (SIMMER et al., 2015). De todos os estudos encontrados que avaliaram a associação entre os níveis de expressão de Dicer e a sobrevida do paciente com câncer, apenas um estudo demonstrou que maiores níveis de expressão de Dicer estavam associados com maior sobrevida do paciente em uma coorte de 331 pacientes (FAGGAD et al., 2012). Além disso, Lai *et al.* (2018) demonstraram que a Dicer participa da resistência ao tratamento com oxaliplatina das células do câncer de cólon humano HCT116 (LAI et al., 2018a). O tratamento com oxaliplatina reduziu a expressão proteica de Dicer enquanto que Drosha, DGCR8 e Ago2 não foram alteradas (LAI et al., 2018b). Essa diminuição na expressão proteica de Dicer foi acompanhada de uma menor viabilidade das células HCT116 (LAI et al., 2018b). Entretanto, quando ocorre a superexpressão de Dicer nas células HCT116, o tratamento com oxaliplatina não é capaz de reduzir a viabilidade celular (LAI et al., 2018b). Ueda *et al.* (2008) demonstraram que o nocaute de Dicer1 nas células HCT116 induz o aumento de expressão de (ICAM)1 que por sua vez aumentou a suscetibilidade das células HCT116 à lise celular pelas células T citotóxicas (UEDA et al., 2009b). Todos esses

resultados vão ao encontro dos nossos resultados que demonstraram associação entre os níveis de expressão de Dicer e a sobrevida do paciente em 3 coortes de pacientes com câncer de cólon que analisamos. Contrariamente, Geng *et al.* (2014) foi o único estudo encontrado por nós que demonstrou que a superexpressão de Dicer nas células HCT116 promoveu redução da viabilidade e migração celular bem como uma interrupção do ciclo celular na fase G0/G1 (GENG *et al.*, 2014). Infelizmente, os estudos de Lai *et al.* (2018) (LAI *et al.*, 2018a), Ueda *et al.* (2008) (UEDA *et al.*, 2009a) e Geng *et al.* (2014) (GENG *et al.*, 2014) não avaliaram os efeitos do nocaute e superexpressão de Dicer nas células HCT116 *in vivo*, verificando se os efeitos encontrados *in vitro* seriam reproduzidos *in vivo*. Interessantemente, Geng *et al.* (2014) demonstraram que a superexpressão do microRNA-103 nas células HCT116 induziu um aumento do crescimento tumoral *in vivo*, enquanto que nocaute do microRNA-103 nas células HCT116 induziu a redução do crescimento tumoral (GENG *et al.*, 2014). Similarmente, Ke *et al.* (2018) demonstraram que a inibição do microRNA-103 nas células do câncer de cólon humano SW620 reduziu a viabilidade celular, a formação de colônias e a migração celular, ao passo que a superexpressão do microRNA-103 promoveu efeitos inversos (KE *et al.*, 2018). Por fim, Zheng *et al.* (2016) também demonstram que a inibição do microRNA-103 nas células do câncer de cólon humano SW620 e LoVo reduziu a viabilidade, invasão e migração celular (ZHENG *et al.*, 2016). Além disso, a superexpressão do microRNA-103 nas células do câncer de cólon humano SW480 promoveu um aumento do crescimento tumoral em comparação à células controle (ZHENG *et al.*, 2016). Mais importante, os autores demonstraram que quanto maior a expressão do microRNA-103 em tumores de pacientes com câncer de cólon, menor a sobrevida do paciente (ZHENG *et al.*, 2016). Portanto, de todos os estudos encontrados que avaliaram o papel do microRNA-103 sobre a progressão e crescimento tumoral do câncer de cólon, todos eles observaram respostas semelhantes. Esses resultados vão ao encontro dos resultados encontrados aqui, no qual nós observamos que no tumor CT26 dos animais imunocompetentes treinados ocorreu uma redução da expressão do microRNA-103, embora nós não tenhamos observado nenhuma diferença entre as células CT26 primárias sedentárias e treinadas. Entretanto, os autores não especificaram qual microRNA-103 exatamente foi superexpresso e inibido (GENG *et al.*, 2014), o que limita a interpretação das nossas comparações.

Em relação à Xpo5, estudos recentes tem demonstrado seu papel no prognóstico do paciente com câncer de cólon e também no crescimento tumoral em modelos animais

(SHIGEYASU et al., 2017; VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2019). Vychytilova-Faltejskova *et al.* (2019) demonstraram em uma coorte de 239 pacientes com câncer de cólon que os níveis de expressão de Xpo5 foram correlacionado com a sobrevida do paciente (VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2019). Os autores observaram que tanto para Xpo5 quanto para Dicer1, quanto menor a expressão de Xpo5 e Dicer1, maior a sobrevida do paciente (VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2019). Resultado semelhantes também foram encontrado por Shigeyasu *et al.* (2017) (SHIGEYASU et al., 2017). Os autores também demonstraram que quanto menor a expressão de Xpo5 nos tumores, maior foi a sobrevida do paciente com câncer de cólon (SHIGEYASU et al., 2017). Além disso, também foi observado que a inibição de Xpo5 nas células tumorais do câncer de cólon humano SW480 reduziu a viabilidade e migração celular, bem como a formação de colônias (SHIGEYASU et al., 2017). Por fim, a inibição de Xpo5 nas células tumorais também reduziu o crescimento tumoral *in vivo* (SHIGEYASU et al., 2017). Embora só 1 das 3 coortes de pacientes que nós analisamos tenha apresentado associação entre os níveis de expressão de Xpo5 e a sobrevida do paciente, os resultados de Vychytilova-Faltejskova *et al.* (2019) (VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA et al., 2019) e Shigeyasu *et al.* (2017) (SHIGEYASU et al., 2017) sugerem que exista uma relação entre os níveis de expressão de Xpo5 e a sobrevida do paciente. Além disso, a inibição de Xpo5 nas células tumorais reduziu o crescimento tumoral.

Portanto, todos esses resultados suportam a ideia de que Dicer e Xpo5 estão associados com o prognóstico do paciente com câncer de cólon e com o crescimento tumoral em modelos animais, e que o treinamento físico reduz a expressão de ambos, culminando na redução da expressão global dos microRNAs.

6 CONCLUSÃO

Até onde temos conhecimento, esse foi o primeiro estudo a realizar análise de microRNA array de tumores de camundongos sedentários e treinados. Demonstramos que essa abordagem exploratória é uma interessante estratégia para a descoberta de novos alvos envolvidos na modulação dos microRNAs descompensados no tumor de cólon, auxiliando assim na caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos nos benefícios à saúde induzidos pelo treinamento físico. Além disso, até onde temos conhecimento, esse foi o

primeiro estudo a demonstrar que os efeitos do treinamento físico sobre o microambiente tumoral e sobre as células tumorais permanecem ao longo do tempo, mesmo na ausência do exercício, fortemente sugerindo que possam ser alterações epigenéticas. Demonstramos que essa abordagem é uma interessante estratégia para a entender os possíveis mecanismos moleculares que tornam uma célula tumoral sensível, ou resistente, ao treinamento físico. Também, até onde temos conhecimento, esse foi o primeiro estudo a demonstrar que o treinamento físico reduz o consumo de exossomos derivados das células tumorais bem como a metástase pulmonar induzida pelo tumor de cólon CT26. Demonstramos que abordagem de cirurgia de remoção do tumor é uma interessante estratégia para a entender os efeitos do treinamento físico sobre a recidiva tumoral e metástase.

Assim, concluímos que os alvos aqui identificados podem dar início a novas linhas de pesquisa que irão auxiliar na compreensão de novos mecanismos relacionados à redução do crescimento tumoral do câncer de cólon induzida pelo treinamento físico. Isso ampliará o conhecimento das bases celulares e moleculares da fisiologia e bioquímica do exercício, dando suporte científico para a recomendação da prática regular de exercício físicos para a saúde e para o paciente com câncer. Por além disso, novos mecanismos, quando desvendados, podem auxiliar no desenvolvimento de intervenções farmacológicas, com o intuito de mimetizar e/ou maximizar alguns dos efeitos benéficos do treinamento físico, principalmente em doenças crônicas degenerativas onde a prática de treinamento físico é proscrita ou ainda não pode ser recomendada.

7 MÉTODOS

7.1 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso com Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, registrado com o número 2018/02, ou de acordo com as diretrizes do *Institutional Animal Care and Use*

Committees (IACUC) e American Association for Laboratory Animal Science (AAALAS) (Protocolo animal: Weill Cornell Medicine 0709-666A).

7.2 Cultura de células tumorais

Foram utilizadas as células tumorais do câncer de cólon CT26 e MC38. As células tumorais foram mantidas em meio de cultura RPMI. O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

7.3 Transdução da luciferase

O vetor lentiviral pLenti PGK V5-LUC puro (Addgene), codifica o gene reporter Firefly Luciferase, foi produzido de acordo com Strauss *et al.* (2006) (STRAUSS *et al.*, 2006). Esse vetor foi então usado para a transdução das células CT26 em um MOI (multiplicidade de infecção) de 0,5 em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e contendo 8 µg/mL de polibreno. As células foram incubadas durante 24 horas e então mantidas continuamente em cultura por 2 semanas na presença de 1,0 µg/mL de puromicina para a seleção de uma população de células estáveis expressando luciferase.

7.4 Animais e modelo tumoral

A amostra desse projeto foi composta por camundongos fêmeas da linhagem BALB/C e C57BL6, e camundongos imunodeficientes atímicos NUDE (Foxn1^{nu}) com idade de 8 semanas. Os animais foram alocados no Biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas plásticas (5 animais por caixa), a uma temperatura ambiente de 22° a 24° C e em ciclo de 12 horas (claro:escuro invertido). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*, sendo a ração normoproteica (12% de proteínas).

Foram injetadas 1x10⁵ células tumorais CT26 subcutaneamente no flanco inferior direito dos camundongos BALB/C e 1x10⁵ células tumorais MC38 subcutaneamente no flanco inferior direito dos camundongos C57BL6. O dia do sacrifício dos camundongos para cada protocolo experimental é descrito em suas respectivas figuras.

7.5 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O treinamento físico foi realizado segundo o protocolo desenvolvido por Ferreira e seus colaboradores em sistema de esteira (FERREIRA et al., 2007). O treinamento físico teve duração de 8 semanas. Todos os animais realizaram 5 sessões semanais com aumento progressivo do tempo, chegando a 60 minutos, e aumento progressivo de sobrecarga de trabalho, chegando a 60% da velocidade máxima conseguida na avaliação da tolerância ao esforço físico máximo que corresponde a intensidade de máxima fase estável de lactato. Esse trabalho é caracterizado como de moderada intensidade com predomínio de metabolismo aeróbio. Para os camundongos imunodeficientes NUDE, o treinamento foi realizado durante 4 semanas antes da injeção das células tumorais.

7.6 Crescimento tumoral

A avaliação do crescimento tumoral foi realizada diariamente após a injeção das células tumorais utilizando um paquímetro. Foram mensurados o maior e o menor diâmetro do tumor de acordo com o descrito por Bergers *et al.*, 2003 (BERGERS et al., 2003). Os valores obtidos foram utilizados na fórmula a seguir para a estimativa do volume tumoral: $V = 0,52 \times (\text{maior diâmetro}) \times (\text{menor diâmetro})^2$.

7.7 Método de sacrifício e coleta de tecidos

Após a anestesia com isoflurano, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical seguindo os preceitos éticos adotados pelo CONCEA. Os camundongos que apresentaram ulcerações nos tumores foram sacrificados e excluídos do estudo.

7.8 Cultura Primária de células tumorais CT26

Os tumores CT26 foram desagregados mecanicamente em pequenos pedaços de, aproximadamente, 1mm³ em placa de cultura. Após a desagregação, os tumores foram mantidos

em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. As células foram mantidas continuamente em cultura por 7 dias na presença de 1,0 µg/mL de puomicina para a seleção de uma população de células tumorais CT26, uma vez que essas apresentam cassete de resistência para puomicina. Após 7 dias, as células tumorais CT26 primárias foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

7.9 Microarray

Foi utilizado a plataforma microRNA Array baseada no sistema miRBase Versão 17.0, com chip 4.0. O experimento foi realizado com os kits da companhia AFFYMETRIX (USA), possibilitando assim a determinação de um perfil de expressão dos microRNAs nos tumores dos camundongos.

7.10 Ensaio de bioluminescência

Para a detecção das bioluminescência por luciferase do tumor e do pulmão *in vivo* e *ex vivo*, os camundongos carregando os tumores CT26 foram injetados retro-orbitalmente com 100 mg kg⁻¹ de massa corporal de luciferin (200µl de 10 mg ml⁻¹ de luciferin em PBS) 5 minutos antes da aquisição das imagens. Um Sistema de imagem de bioluminescência IVIS SpectrumCT (PerkinElmer) foi usado para as análises. A bioluminescência foi analisada pela quantificação do fluxo total de fótons (photons s⁻¹) usando o software Living Image (Caliper Life Sciences).

7.11 Diagrama de Venn

O diagrama de Venn foi gerado usando a plataforma InteractiVenn (HEBERLE et al., 2015).

7.12 Expressão gênica e de microRNAs

A expressão dos genes de interesse foi avaliada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando TRIzol (Thermo Scientific) para os tumores. As concentrações e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich). A transcrição reversa do RNA (síntese de cDNA) para a análise de expressão gênica foi realizada utilizando High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR (Viia7 Real-Time PCR system, Applied Biosystems) utilizando primers específicos e Power SYBR® Green Master Mix (Thermo Scientific) para os genes. Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) como descrito pelo produtor do sistema. Os primers específicos de cada gene foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Como genes normalizadores, foram utilizado a ciclofilina para os tumores CT26 e MC38.

O cDNA para análise de microRNAs foi sintetizado a partir do RNA total utilizando primers específicos para cada microRNA analisado de acordo com o protocolo TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystems, CA, USA). Foram utilizados 10 ng de RNA para preparar uma RT master mix com dNTPs 100mM, multiscribe reverse transcriptase 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml. A reação de PCR para os microRNAs foi realizada a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e após as amostras foram mantidas a 4°C. Para a reação de (RT-PCR) para expressão de microRNAs foram usados 20µl da reação de PCR e adicionados 1,33µl do produto RT, 10µl de TaqMan 2X Universal PCR master mix II (No AmpErase UNG), 1µl de primer (TaqMan microRNA Assay 20X) e 7,67µl de água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Foi utilizado o U6 snRNA como normalizador para análise de cada microRNA testado.

Tabela 6 – Lista de Primers.

Gene	Forward (5' > 3')	Reverse (5' > 3')
------	-------------------	-------------------

mE2f1	TGACCATCAGTACCTCGCTG	CGGAGATTTACACCTTTCCCT
mMcm2	ATCTTTGCCAGCATTGCACC	TGTGCTTTCCACCTGGGTTC
mMcm3	AGCAAACTCGTTCCAAGGATG	AGCAAGCAGAGGATTGCCTT
mMcm4	CCTCGTACTGGCATTGTGGA	AGAAGTGGCACTCATTCCTGT
mMcm5	TCTCCATTGCTAAAGCTGGGA	TCTCATCCCATCGGCCAAAC
mMcm6	ACGCGGTGTCTTACTGATGTT	CTCGTCCACGTGCTTGAGAAA
mTop2a	GATGCCAACGATGCAGGGAG	ACCACTCCAAGGCCTGAAAC
mCnd1	GCCATGACTCCCCACGATTT	TTGTTCTCATCCGCCTCTGG
mFoxm1	CAGGAGAGCTATGCTGGTG	GCCCGTCAGAACTCATCTTTC
mCiclofilina	TGGCAAGCATGTGGTCTTTGGGAAG	GGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGCCATTC
mPten	CGGAACCTGCAATCCTCAGTTT	TGATATCACCACACACAGGCA
mPi3k (Pik3r1)	ACAGTAGGAGGAGGTTGGAAGA	GCGTCAGCCACATCAAGTATT
mTgfr2	GGAAACGTGGAGTCGTTC	CGTAATCCTTCACTTCTCCCACA
mDapk1	TTGCAGGAGGTGAGCTGTTT	TGTTTTCCGGCTTCAGGTCA
mApc	CTTGTGGCCCAGTTAAATCTGA	CGCTTTTGAGGGTTGATTCCT
mSrc	GAACCCGAGAGGGACCTTC	GAGGCAGTAGGCACCTTTTGT
mKras	CAAGAGCGCTTGACGATACA	CCAAGAGACAGGTTTCTCCATC
mP53	ACCCTGGCACCTACAATGAA	AAATGCAGACAGGCTTTGCAG
mHif1an (FIH)	GCTCATTGGCATGGAAGGAAA	TCGAACTGATCCGGAGGAAA
mIl8rb	AGCCTTGAGTCACAGAGAGTTG	ATCTTTGAGGTAAACTTAATCCTGC
mVegfa	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGCT
mHif1α	ATGGCCCAGTGAGAAAAGGG	AGTGAAGCACCTTCCACGTT
mDicer	ACCAAGTGATCCGTTTACGC	CAACCGTACACTGTCCATCG
mDrosha	GGACCATCACGAAGGACACT	CACGGGTCTCTTGGTTTTGT
mDGCR8	ACGCATGTATGGTCGTGAGA	TGCTCAGGATGTGAAGGTTG
mPACT	CTCCTCAGTCTCCGAACAC	TACTGTCCGTTGGCACTCAG
mTRBP	CTATCCCTTCGCAGTTGCTC	CCACTCAGGCTCAGTTCCTC
mAgo-2	CCACCCCACTGAGTTTGACT	AACGATTGTCATCCCAAAGC
mXpo-5	GGTGGTCAACATCTGGCTTT	AGATCAGCACCCACATAGGC

7.13 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado em câmaras transwel” (membrana porosa de 8 μ m) de 24 poços com câmaras superior e inferior (Corning Life Science, EUA). As células CT26 primárias sedentárias e treinadas na densidade de 1×10^5 células/mL foram colocadas na porção superior da câmara em meio de cultura sem soro fetal bovino. Para a indução da migração celular foi adicionado meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino na porção inferior da câmara. Após 24 horas, as células que migraram ficaram na parte

inferior da mesma. A parte superior foi raspada delicadamente para remover as células que não migraram. Após a remoção das células que não migraram, foi adicionada luciferina às células e 5 minutos depois foi realizado o ensaio de bioluminescência. A bioluminescência foi analisada pela quantificação do fluxo total de fótons (photons s^{-1}) usando o software Living Image (Caliper Life Sciences).

7.14 Ensaio viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular das células CT26 primárias foi utilizado o Invitrogen™ CyQUANT™ MTT Cell Proliferation Assay Kit seguindo as instruções do fabricante. O método é baseado no ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) conforme descrito por MOSMANN (1983) (MOSMANN, 1983). Esse método colorimétrico baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, em converter o substrato dimetiltiazol, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel na água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

7.15 Purificação, caracterização e análise dos exossomos derivados das células CT26

Os exossomos das células CT26 e das células CT26 primárias foram purificadas por ultracentrifugações sequenciais. A contaminação celular foi removida do sobrenadante das culturas celulares por centrifugação em 500xg por 10 minutos. Para remover corpos apoptóticos e grandes debris celulares, o sobrenadante foi centrifugado em 3000xg por 20 minutos, seguido por centrifugação em 12000xg por 20 minutos para remover grandes microvesículas. Inalmente, os exossomos foram coletados por ultracentrifugação em tubos de ultracentrifugação de 4 ou 31 mL (#355645 and #355631, Beckman Coulter) em 100.000xg for 70 minutos. Os exossomos foram lavados em PBS e ultracentrifugados novamente em 100.000xg em rotores ângulo-fixados de 50.4T1 ou 70Ti na ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XE or XPE ultracentrifuge. O pellet final de exossomos foi ressuspensionado em PBS, e a concentração proteica foi mensurada por BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific). O número e o tamanho dos

exossomos foi analisado usando o sistema de caracterização de nanopartículas NS500 (NanoSight, Malvern Instruments) equipado com laser violeta (405nm).

7.16 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a marcação negativa da análise de microscopia eletrônica de transmissão, 0.1 mg/ml de exossomos em PBS foram colocados em uma grade revestida com formvar /carbono e deixados em repouso por 1 minuto. As amostras foram manchadas e coradas negativamente com 4 gotas sucessivas de 1,5% de acetato de uranila (aqu), manchando as amostras entre cada gota. Após a última gota da marcação, a grade foi enxugada e seca ao ar. As grades foram fotografadas com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JSM 1400 (JEOL, USA, Ltd, Peabody, MA) operando a 100Kv. As imagens foram capturadas em uma câmera Veleta 2K x 2K CCD (Olympus-SIS, Munich, Germany).

7.17 Biodistribuição dos exossomos derivados das células CT26

Os exossomos foram primeiramente marcado com *near-infrared dye* CellVue NIR815 (eBioscience) seguindo as especificações do fabricante, seguindo por lavagem com PBS e peletando os exossomos por ultracentrifugação em 100.000g por 70 minutos em 10 °C. Os exossomos marcados (10 µg) foram ressuspensos em 100 µl de PBS, ou um volume equivalente de uma mistura com a reação mock, foram retro orbitalmente injetados em camundongos sedentários ou treinados, ou em camundongos sedentários ou em camundongos sedentários imediatamente após uma sessão aguda de exercício. 24 horas após a injeção, os tecidos foram coletados e analisando o sistema de imagem Odyssey (LI-COR Biosciences).

7.18 miRNet

Para a análise de vias enriquecidas e dos genes alvos e preditos para os microRNAs diferencialmente expressos, foi usada a plataforma miRNet (<https://www.mirnet.ca/>).

7.19 Análise de sobrevivência dos camundongos

Os camundongos foram apalpados diariamente para verificar a presença do tumor. Após a confirmação da presença do tumor, os camundongos foram examinados diariamente. Por questões éticas, a sobrevida foi determinada considerando-se uma baixa probabilidade do animal sobreviver por mais de 24 horas.

7.20 *Análise de sobrevida de pacientes com câncer de cólon*

A curva de Kaplan Meier para a sobrevida dos pacientes com câncer de cólon foi gerada pelas análises de *microarray* ou sequenciamento de RNA e visualizada pela plataforma R2 (<http://r2.amc.nl>) usando os seguintes *datasets*: “R2: Tumor Mixed Colon Adenocarcinoma – TCGA – 174 – custom – agg4502a073”, “R2: Tumor Colon (Core-Exon) – Sveen – 333 – rna_sketch – huex10p”, e “R2: Tumor Colon CIT (Combat) – Marisa – 566 – rma – u133p2”. Além disso, também foi usada a plataforma UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) para a análise de sobrevida global dos pacientes com câncer de cólon usando a seguinte coorte de pacientes: “TCGA-COAD – Colon Adenocarcinoma”.

7.21 *Análise Estatística*

Os resultados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média. Conforme o desenho experimental, foi aplicado teste *t-Student* bicaudal para amostras não-pareadas ou análise de variância (ANOVA) para um caminhos. No caso de interação significativa na ANOVA, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey. A análise de medidas repetidas por modelo misto foi usada para comparar as diferenças entre os grupos ao longo do tempo. O nível de significância adotado neste estudo foi de $p < 0,05$.

8 REFERÊNCIAS

ALDERTON, Gemma K. Tumour evolution: Epigenetic and genetic heterogeneity in metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 141–141, 2017. DOI: 10.1038/nrc.2017.11. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc.2017.11>.

AMBROS, Victor. microRNAs: Tiny regulators with great potential. **Cell**, [S. l.], v. 107, n. 7, p. 823–826, 2001. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00616-X.

AOI, Wataru et al. Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 399, n. 1, p. 14–19, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.023>.

AOI, Wataru et al. A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. **Gut**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 882–889, 2013. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300776. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851666>.

BALTGALVIS, Kristen A.; BERGER, Franklin G.; PEÑA, Maria Marjorette O.; DAVIS, J. Mark; CARSON, James A. Effect of exercise on biological pathways in ApcMin/+ mouse intestinal polyps. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 104, n. 4, p. 1137–1143, 2008. DOI: 10.1152/japplphysiol.00955.2007.

BALTGALVIS, Kristen A.; BERGER, Franklin G.; PEÑA, Maria Marjorette O.; DAVIS, J. Mark; CARSON, James A. The Interaction of a High-Fat Diet and Regular Moderate Intensity Exercise on Intestinal Polyp Development in Apc Min/+ Mice. **Cancer Prevention Research**, [S. l.], v. 2, n. 7, p. 641–649, 2009. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0017. Disponível em: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0017>.

BARDHAN, Kankana; LIU, Kebin. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. **Cancers**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 676–713, 2013. DOI: 10.3390/cancers5020676. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.

BASTERFIELD, Laura; MATHERS, John C. Intestinal tumours, colonic butyrate and sleep in exercised Min mice. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. 355–363, 2010. DOI: 10.1017/S0007114510000528. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114510000528/type/journal_article.

BECKER, Annette; THAKUR, Basant Kumar; WEISS, Joshua Mitchell; KIM, Han Sang; PEINADO, Héctor; LYDEN, David. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 836–848, 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.009. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610816304962>.

BEDOYA, Claudia Alvarez Florez et al. Exercise during preoperative therapy increases tumor vascularity in pancreatic tumor patients. **Scientific Reports**, [S. l.], n. January, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-49582-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-49582-3>.

BERGER, Shelley L.; KOUZARIDES, Tony; SHIEKHATTAR, Ramin; SHILATIFARD, Ali. An operational definition of epigenetics An operational definition of epigenetics An operational definition of epigenetics. **DNA Sequence**, [S. l.], p. 23–25, 2009. DOI: 10.1101/gad.1787609.Copyright.

BERGERS, Gabriele; SONG, Steven; MEYER-MORSE, Nicole; BERGSLAND, Emily;

HANAHAN, Douglas. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 111, n. 9, p. 1287–1295, 2003. DOI: 10.1172/JCI200317929.

BETOF, Allison S.; LASCOLA, Christopher D.; WEITZEL, Douglas; LANDON, Chelsea; SCARBROUGH, Peter M.; DEVI, Gayathri R.; PALMER, Gregory; JONES, Lee W.; DEWHIRST, Mark W. Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia, and chemotherapeutic response by exercise. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 1–5, 2015. DOI: 10.1093/jnci/djv040.

BOOTH, Frank W.; ROBERTS, Christian K.; LAYE, Matthew J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 1143–1211, 2012. DOI: 10.1002/cphy.c110025.

BU, Pengcheng et al. A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets notch in colon cancer stem cells. **Cell Stem Cell**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 602–615, 2013. DOI: 10.1016/j.stem.2013.03.002.

BU, Pengcheng et al. A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. **Cell Stem Cell**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 189–202, 2016. DOI: 10.1016/j.stem.2016.01.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.006>.

BUSS, Linda A.; ANG, Abel D.; HOCK, Barry; ROBINSON, Bridget A.; CURRIE, Margaret J.; DACHS, Gabi U. Effect of post-implant exercise on tumour growth rate, perfusion and hypoxia in mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0229290. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229290>.

CARDOSO, Ana Carolina Ferreira; ANDRADE, Luciana Nogueira de Sousa; BUSTOS, Silvina Odete; CHAMMAS, Roger. Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 6, n. May, p. 1–12, 2016. DOI: 10.3389/fonc.2016.00127. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2016.00127/abstract>.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 126–31, 1985. DOI: 10.2307/20056429. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3920711> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1424733>.

CASTLE, John C. et al. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-190.

CHAMMAS, Roger. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista Médica**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i1p21-31>.

CHAMMAS, Roger; DE SOUSA ANDRADE, Luciana Nogueira; JANCAR, Sonia. Oncogenic effects of PAFR ligands produced in tumours upon chemotherapy and radiotherapy. **Nature**

Reviews Cancer, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 253, 2017. DOI: 10.1038/nrc.2017.15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.15>.

CHAN, Jennifer A.; KRICHEVSKY, Anna M.; KOSIK, Kenneth S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Research**, [S. l.], v. 65, n. 14, p. 6029–6033, 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0137.

CHANDRASHEKAR, Darshan S.; BASHEL, Bhuwan; BALASUBRAMANYA, Sai Akshaya Hodigere; CREIGHTON, Chad J.; PONCE-RODRIGUEZ, Israel; CHAKRAVARTHI, Balabhadrapatruni V. S. K.; VARAMBALLY, Sooryanarayana. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. **Neoplasia (United States)**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 649–658, 2017. DOI: 10.1016/j.neo.2017.05.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>.

CHEN, Gang et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. **Nature**, [S. l.], v. 560, n. 7718, p. 382–386, 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0392-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>.

CHEN, T.; SUN, Y.; JI, P.; KOPETZ, S.; ZHANG, W. Topoisomerase II α in chromosome instability and personalized cancer therapy. **Oncogene**, [S. l.], v. 34, n. 31, p. 4019–4031, 2015. DOI: 10.1038/onc.2014.332.

CHEN, Xiangzheng et al. Salidroside alleviates cachexia symptoms in mouse models of cancer cachexia via activating mTOR signalling. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 225–232, 2016. DOI: 10.1002/jcsm.12054.

CHEN, Xiao et al. Dicer regulates non-homologous end joining and is associated with chemosensitivity in colon cancer patients. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 873–882, 2017. DOI: 10.1093/carcin/bgx059.

CHOI, Woonyoung et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 152–165, 2014. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.009>.

CLANCY, James W.; ZHANG, Ye; SHEEHAN, Colin; D’SOUZA-SCHOREY, Crislyn. An ARF6–Exportin-5 axis delivers pre-miRNA cargo to tumour microvesicles. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 856–866, 2019. DOI: 10.1038/s41556-019-0345-y. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41556-019-0345-y>.

COLBERT, Lisa H. et al. Exercise and intestinal polyp development in APCMin mice. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 1662–1669, 2003. DOI: 10.1249/01.MSS.0000089349.54813.41.

CRAMER, Larissa et al. Cardiovascular function and predictors of exercise capacity in patients with colorectal cancer. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 64, n. 13, p. 1310–1319, 2014. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.07.948.

DAVALOS, Veronica; ESTELLER, Manel. Rolling the Dice to Discover the Role of DICER in Tumorigenesis. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 717–719, 2012. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.030>.

DEMARZO, Marcelo Marcos Piva; MARTINS, Lisandra Vanessa; FERNANDES, Cleverson Rodrigues; HERRERO, Fábio Augusto; PEREZ, Sérgio Eduardo De Andrade; TURATTI, Aline; GARCIA, Sérgio Britto. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 618–621, 2008. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318163274d.

DETHLEFSEN, Christine; HANSEN, Louise S.; LILLELUND, Christian; ANDERSEN, Christina; GEHL, Julie; CHRISTENSEN, Jesper F.; PEDERSEN, Bente K.; HOJMAN, Pernille. Exercise-induced catecholamines activate the Hippo tumor suppressor pathway to reduce risks of breast cancer development. **Cancer Research**, [S. l.], v. 77, n. 18, p. 4894–4904, 2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3125. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-3125>.

DEVIN, James L.; HILL, Michelle M.; MOURTZAKIS, Marina; QUADRILATERO, Joe; JENKINS, David G.; SKINNER, Tina L. Acute high intensity interval exercise reduces colon cancer cell growth. **The Journal of Physiology**, [S. l.], v. 8, p. 2177–2184, 2019. DOI: 10.1113/JP277648. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1113/JP277648>.

DUFRESNE, Suzanne et al. Exercise training improves radiotherapy efficiency in a murine model of prostate cancer. **FASEB Journal**, [S. l.], n. July 2019, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1096/fj.201901728R.

EGAN, Brendan; ZIERATH, Juleen R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.12.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>.

FABER, C.; HORST, D.; HLUBEK, F.; KIRCHNER, T. Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 47, n. 9, p. 1414–1419, 2011. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.01.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.01.006>.

FAGGAD, Areeg; KASAJIMA, Atsuko; WEICHERT, Wilko; STENZINGER, Albrecht; ELWALI, Nasr Eldin; DIETEL, Manfred; DENKERT, Carsten. Down-regulation of the microRNA processing enzyme dicer is a prognostic factor in human colorectal cancer. **Histopathology**, [S. l.], v. 61, n. 4, p. 552–561, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.04110.x.

FERNANDES, L. G.; TOBIAS, G. C.; PAIXÃO, A. O.; DOURADO, P. M.; VOLTARELLI, V. A.; BRUM, P. C. Exercise training delays cardiac remodeling in a mouse model of cancer cachexia. **Life Sciences**, [S. l.], v. 260, n. December 2019, p. 118392, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118392. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118392>.

FERNANDES, Tiago; BARRETTI, Diego Lopes; PHILLIPS, M. Ian; MENEZES OLIVEIRA, Edilamar. Exercise training prevents obesity-associated disorders: Role of miRNA-208a and MED13. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], 2018. a. DOI: 10.1016/j.mce.2018.05.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.05.004>.

FERNANDES, Tiago; CASAES, Lilian Biondi; SOCI, Ursula Paula Renó; SILVEIRA, André Casanova; GOMES, João Lucas Penteado; BARRETTI, D.; ROQUE, FR; OLIVEIRA, EM. **Exercise training restores the cardiac microRNA-16 levels preventing microvascular**

rarefaction in obese Zucker rats. [s.l: s.n.].

FERNANDES, Tiago; CASAES, Lilian; SOCI, Úrsula; SILVEIRA, Andre; GOMES, João; BARRETTI, Diego; ROQUE, Fernanda; OLIVEIRA, Edilamar. Exercise Training Restores the Cardiac Microrna-16 Levels Preventing Microvascular Rarefaction in Obese Zucker Rats. **Obesity Facts**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 15–24, 2018. b. DOI: 10.1159/000454835.

FERNANDES, Tiago; MAGALHÃES, Flávio C.; ROQUE, Fernanda R.; PHILLIPS, M. Ian; OLIVEIRA, Edilamar M. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: Role of microRNAs-16, -21, and -126. **Hypertension**, [S. l.], v. 59, n. 2 SUPPL. 1, p. 513–520, 2012. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185801.

FERREIRA, Julio C. B.; ROLIM, Natale P. L.; BARTHOLOMEU, Jan B.; GOBATTO, Claudio A.; KOKUBUN, Eduardo; BRUM, Patricia C. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.

FIUZA-LUCES, C.; GARATACHEA, N.; BERGER, N. A.; LUCIA, A. Exercise is the Real Polypill. **Physiology**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 330–358, 2013. DOI: 10.1152/physiol.00019.2013. Disponível em: <http://physiologyonline.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiol.00019.2013>.

FLACHENECKER, Peter. Autoimmune diseases and rehabilitation. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 219–225, 2012. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.05.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.05.016>.

FLAVAHAN, William A.; GASKELL, Elizabeth; BERNSTEIN, Bradley E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science**, [S. l.], v. 357, n. 6348, 2017. DOI: 10.1126/science.aal2380.

FRIEDENREICH, C. M.; CUST, A. E. Physical activity and breast cancer risk: Impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. **British Journal of Sports Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 636–647, 2008. DOI: 10.1136/bjsm.2006.029132.

FUKU, NORIYUKI; OCHIAI, MASAKO; TERADA, SHIN; FUJIMOTO, ERI; NAKAGAMA, HITOSHI; TABATA, IZUMI. Effect of Running Training on DMH-Induced Aberrant Crypt Foci in Rat Colon. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 70–74, 2007. DOI: 10.1249/01.mss.0000239398.78331.96. Disponível em: <http://journals.lww.com/00005768-200701000-00012>.

GARZON, Ramiro; MARCUCCI, Guido; CROCE, Carlo M. Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 775–789, 2010. DOI: 10.1038/nrd3179. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3179>.

GENG, Li; SUN, Bing; GAO, Bo; WANG, Zheng; QUAN, Cheng; WEI, Feng; FANG, Xue Dong. MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 8458–8472, 2014. DOI: 10.3390/ijms15058458.

GLASS, Oliver K. et al. Differential response to exercise in claudin-low breast cancer. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 60, p. 100989–101004, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.21054.

GOH, Jorming; TSAI, Jesse; BAMMLER, Theo K.; FARIN, Frederico M.; ENDICOTT, Emma; LADIGES, Warren C. Exercise training in transgenic mice is associated with attenuation of early breast cancer growth in a dose-dependent manner. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. e80123, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0080123.

GOMES, João Lucas Penteado; FERNANDES, Tiago; SOCI, Ursula Paula Reno; SILVEIRA, André Casanova; BARRETTI, Diego Lopes Mendes; NEGRÃO, Carlos Eduardo; OLIVEIRA, Edilamar Menezes. Obesity Downregulates MicroRNA-126 Inducing Capillary Rarefaction in Skeletal Muscle: Effects of Aerobic Exercise Training. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/2415246.

HANAHAN, D.; WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. **Cell Press**, [S. l.], v. 100, n. 7, p. 57–70, 2000. Disponível em: https://learn.bu.edu/bbcswebdav/pid-1907247-dt-content-rid-6864208_1/courses/14sprgengbe745_a1/Lecture 9 - Hallmarks of Cancer.pdf.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HEBERLE, Henry; MEIRELLES, Vaz G.; DA SILVA, Felipe R.; TELLES, Guilherme P.; MINGHIM, Rosane. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1186/s12859-015-0611-3.

HIGGINS, Kristin A.; PARK, Dongkyoo; LEE, Gee Young; CURRAN, Walter J.; DENG, Xingming. Exercise-induced lung cancer regression: Mechanistic findings from a mouse model. **Cancer**, [S. l.], v. 120, n. 21, p. 3302–3310, 2014. DOI: 10.1002/cncr.28878.

HILLMAN, Charles H.; ERICKSON, Kirk I.; KRAMER, Arthur F. Be smart, exercise your heart: Exercise effects on brain and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 58–65, 2008. DOI: 10.1038/nrn2298.

HOFFMAN, S. A.; PASCHKIS, K. E.; DEBIAS, D. A.; CANTAROW, A.; WILLIAMS, T. L. The Influence of Exercise on the Growth of Transplanted Rat Tumors. **Cancer Research**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 597–599, 1962.

HOJMAN, Pernille et al. Voluntary exercise prevents cisplatin-induced muscle wasting during chemotherapy in mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e109030, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109030.

HONG, Yang; LEE, Rosalind C.; AMBROS, Victor. Structure and function analysis of LIN-14, a temporal regulator of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 2285–2295, 2000. DOI: 10.1128/MCB.20.6.2285-2295.2000.

HORAK, Martin; NOVAK, Jan; BIENERTOVA-VASKU, Julie. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 410, n. 1, p. 1–13, 2016. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.12.013.

HU, Jing et al. MiR-215 Is Induced Post-transcriptionally via HIF-Drosha Complex and Mediates Glioma-Initiating Cell Adaptation to Hypoxia by Targeting KDM1B. **Cancer Cell**,

[S. l.], v. 29, n. 1, p. 49–60, 2016. a. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.12.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.005>.

HU, Jing et al. MiR-215 Is Induced Post-transcriptionally via HIF-Drosha Complex and Mediates Glioma-Initiating Cell Adaptation to Hypoxia by Targeting KDM1B. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 49–60, 2016. b. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.12.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.005>.

HWANG, Ji Hui et al. Mobilizing serum factors and immune cells through exercise to counteract age-related changes in cancer risk. **Exercise immunology review**, [S. l.], v. 26, p. 80–99, 2020.

ICHIM, Gabriel; TAIT, Stephen W. G. A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 539–548, 2016. DOI: 10.1038/nrc.2016.58. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.

ISANEJAD, Amin; ALIZADEH, Ali Mohammad; AMANI SHALAMZARI, Sadegh; KHODAYARI, Hamid; KHODAYARI, Saeed; KHORI, Vahid; KHOJASTEHNJAD, Najmeh. 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 Sciences**, [S. l.], v. 151, p. 30–40, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.090. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.090>.

JOHNSON, Douglas B. et al. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 375, n. 18, p. 1749–1755, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1609214. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1609214>.

JONES, Lee W. et al. Cardiopulmonary function and age-related decline across the breast cancer: Survivorship continuum. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 30, n. 20, p. 2530–2537, 2012. DOI: 10.1200/JCO.2011.39.9014.

JU, Jihyeung; NOLAN, Bonnie; CHEH, Michelle; BOSE, Mousumi; LIN, Yong; WAGNER, George C.; YANG, Chung S. Voluntary exercise inhibits intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice and azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. **BMC cancer**, [S. l.], v. 8, n. 316, p. 316, 2008. DOI: 10.1186/1471-2407-8-316.

KE, Jin; SHAO, Weiwei; JIANG, Yasu; XU, Junfei; LI, Feng; QIN, Jun. **MicroRNA-103 regulates tumorigenesis in colorectal cancer by targeting ZO-1** *Molecular Medicine Reports*, 2018. DOI: 10.3892/mmr.2017.8007.

KELLY, Scott A.; ZHAO, Liyang; JUNG, Kuo-Chen; HUA, Kunjie; THREADGILL, David W.; KIM, Yunjung; DE VILLENA, Fernando Pardo Manuel; POMP, Daniel. Prevention of tumorigenesis in mice by exercise is dependent on strain background and timing relative to carcinogen exposure. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 43086, 2017. DOI: 10.1038/srep43086. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep43086>.

KHORI, Vahid 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**, [S. l.], v. 765, p. 179–187, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.08.031. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.031>.

KIM, Aeyung; IM, Minju; GU, Min Jung; MA, Jin Yeul. Citrus unshiu peel extract alleviates cancer-induced weight loss in mice bearing CT-26 adenocarcinoma. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. April, p. 24214, 2016. DOI: 10.1038/srep24214. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep24214>.

KIM, Aeyung; IM, Minju; MA, Jin Yeul. A novel herbal formula, SGE, induces endoplasmic reticulum stress-mediated cancer cell death and alleviates cachexia symptoms induced by colon-26 adenocarcinoma. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 23, p. 16284–16296, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.24616.

KNOLS, Ruud; AARONSON, Neil K.; UEBELHART, Daniel; FRANSEN, Jaap; AUFDEMKAAMPE, Geert. Physical exercise in cancer patients during and after medical treatment: A systematic review of randomized and controlled clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 23, n. 16, p. 3830–3842, 2005. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.148.

KOCH, Lauren Gerard et al. Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. **Circulation Research**, [S. l.], v. 109, n. 10, p. 1162–1172, 2011. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253807.

KODAHL, Annette R.; LYNNG, Maria B.; BINDER, Harald; COLD, Søren; GRAVGAARD, Karina; KNOOP, Ann S.; DITZEL, Henrik J. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: A case control study. **Molecular Oncology**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 874–883, 2014. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.03.002.

KOELWYN, Graeme J.; JONES, Lee W.; MOSLEHI, Javid. Unravelling the causes of reduced peak oxygen consumption in patients with cancer: Complex, timely, and necessary. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 64, n. 13, p. 1320–1322, 2014. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.07.949.

KOKKINOS, P. et al. Exercise Capacity and Mortality in Black and White Men. **Circulation**, [S. l.], v. 117, n. 5, p. 614–622, 2008. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734764. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734764>.

LABBÉ, David P. et al. TOP2A and EZH2 provide early detection of an aggressive prostate cancer subgroup. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 23, n. 22, p. 7072–7083, 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0413.

LAI, Hui Huang; LIN, Li Jyuan; HUNG, Liang Yi; CHEN, Pai Sheng. Role of Dicer in regulating oxaliplatin resistance of colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 506, n. 1, p. 87–93, 2018. a. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.071. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.071>.

LAI, Hui Huang; LIN, Li Jyuan; HUNG, Liang Yi; CHEN, Pai Sheng. Role of Dicer in regulating oxaliplatin resistance of colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 506, n. 1, p. 87–93, 2018. b. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.071.

LAKOSKI, Susan G. et al. Midlife cardiorespiratory fitness, incident cancer, and survival after cancer in men: The Cooper Center Longitudinal Study. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 231–237, 2015. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.0226. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181028>.

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, [S. l.], v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.

LIGIBEL, Jennifer A. et al. Impact of a pre-operative exercise intervention on breast cancer proliferation and gene expression: Results from the pre-operative health and body (PreHAB) study. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 25, n. 17, p. 5398–5406, 2019. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3143.

LIM, Ji Hong; LUO, Chi; VAZQUEZ, Francisca; PUIGSERVER, Pere. Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. **Cancer Research**, [S. l.], v. 74, n. 13, p. 3535–3545, 2014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2893-T.

LIN, Xing Yu; CHEN, Si Zeng. Calpain inhibitors ameliorate muscle wasting in a cachectic mouse model bearing CT26 colorectal adenocarcinoma. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 1601–1610, 2017. DOI: 10.3892/or.2017.5396.

LIU, Jianhua; LIU, Weiwei; LIU, Yan; ZHOU, Xiuzhen; ZHANG, Zhijie; SUN, Zhengrong. **Prevalence of microorganisms co-infections in human papillomaviruses infected women in Northern China**. [s.l.: s.n.]. v. 293 DOI: 10.1007/s00404-015-3826-7. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.

LU, Fanghui et al. Olig2-Dependent Reciprocal Shift in PDGF and EGF Receptor Signaling Regulates Tumor Phenotype and Mitotic Growth in Malignant Glioma. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 669–683, 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.027. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610816301106>.

LU, Min; SANDERSON, Sydney M.; ZESSIN, Amelia; ASHCRAFT, Kathleen A.; JONES, Lee W.; DEWHIRST, Mark W.; LOCASALE, Jason W.; HSU, David S. Exercise inhibits tumor growth and central carbon metabolism in patient-derived xenograft models of colorectal cancer. [S. l.], p. 1–11, 2018.

LUNZ, W.; PELUZIO, M. C. G.; DIAS, C. M. G. C.; MOREIRA, A. P. B.; NATALI, A. J. Long-term aerobic swimming training by rats reduces the number of aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 41, n. 11, p. 1000–1004, 2008. DOI: 10.1590/S0100-879X2008001100009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2008001100009&lng=en&tlng=en.

LUO, Chi; LIM, Ji Hong; LEE, Yoonjin; GRANTER, Scott R.; THOMAS, Ajith; VAZQUEZ, Francisca; WIDLUND, Hans R.; PUIGSERVER, Pere. A PGC1 α -mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis. **Nature**, [S. l.], v. 537, n. 7620, p. 422–426, 2016. DOI: 10.1038/nature19347. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature19347>.

MANDAL, Rajarsi et al. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. **Science**, [S. l.], v. 364, n. 6439, p. 485–491, 2019. DOI: 10.1126/science.aau0447.

MARTÍN-RUIZ, Asunción et al. Benefits of exercise and immunotherapy in a murine model of human non-small-cell lung carcinoma. **Exercise immunology review**, [S. l.], v. 26, n. 10, p.

100–115, 2020.

MCCLELLAN, Jamie L.; STEINER, Jennifer L.; DAY, Stani D.; ENOS, Reilly T.; DAVIS, Mark J.; SINGH, Udai P.; MURPHY, E. Angela. Exercise effects on polyp burden and immune markers in the Apc Min/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 861–868, 2014. DOI: 10.3892/ijo.2014.2457.

MEHL, K. A. Decreased intestinal polyp multiplicity is related to exercise mode and gender in ApcMin/+ mice. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 2219–2225, 2005. DOI: 10.1152/jappphysiol.00975.2004. Disponível em: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jappphysiol.00975.2004>.

MELO, Sonia A. et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 707–721, 2014. a. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.09.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.005>.

MELO, Stéphan F. S.; FERNANDES, Tiago; BARAÚNA, Valério G.; MATOS, Katt C.; SANTOS, Alexandra A. S.; TUCCI, Paulo J. F.; OLIVEIRA, Edilamar M. Expression of microRNA-29 and collagen in cardiac muscle after swimming training in myocardial-infarcted rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 657–669, 2014. b. DOI: 10.1159/000358642.

MELO, Stéphan Freitas Soares; BARAUNA, Valério Garrone; CARNEIRO JÚNIOR, Miguel Araújo; BOZI, Luiz Henrique Marchesi; DRUMMOND, Lucas Rios; NATALI, Antônio José; DE OLIVEIRA, Edilamar Menezes. Resistance training regulates cardiac function through modulation of miRNA-214. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 6855–6867, 2015. a. DOI: 10.3390/ijms16046855.

MELO, Stéphan Freitas Soares; BARAUNA, Valério Garrone; NEVES, Vander José; FERNANDES, Tiago; LARA, Lucienne da Silva; MAZZOTTI, Diego Robles; OLIVEIRA, Edilamar Menezes. Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca²⁺ handling after myocardial infarction. **BMC Cardiovascular Disorders**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 4–11, 2015. b. DOI: 10.1186/s12872-015-0156-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12872-015-0156-4>.

MICHNA, Laura et al. Inhibitory effects of voluntary running wheel exercise on UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 2108–2115, 2006. DOI: 10.1093/carcin/bgl057.

MILLER, Kimberly D.; SIEGEL, Rebecca L.; LIN, Chun Chieh; MARIOTTO, Angela B.; KRAMER, Joan L.; ROWLAND, Julia H.; STEIN, Kevin D.; ALTERI, Rick; JEMAL, Ahmedin. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016. DOI: 10.3322/caac.21349. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21349>.

MINCIACCHI, V. et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. **Oncotarget**, [S. l.], v. 6, n. 13, p. 11327–11341, 2015. Disponível em: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%255B%255D=3598&path%255B%255D=7307>.

MOORE, Steven C. et al. Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. **JAMA Internal Medicine**, [S. l.], v. 175, n. 6, p. 959–967, 2016. a. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.1548.

MOORE, Steven C. et al. Association of leisure-time physical activity with risk of 26 types of cancer in 1.44 million adults. **JAMA Internal Medicine**, [S. l.], v. 176, n. 6, p. 816–825, 2016. b. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.1548.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MÜLLER, Sören; NOWAK, Katharina. Exploring the miRNA-mRNA regulatory network in clear cell renal cell carcinomas by next-generation sequencing expression profiles. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, n. 948408, p. 1–11, 2014. DOI: 10.1155/2014/948408.

MUÑOZ-PINEDO, Cristina; GONZÁLEZ-SUÁREZ, Eva; PORTELA, Anna; GENTILELLA, Antonio; ESTELLER, Manel. Exploiting tumor vulnerabilities: Epigenetics, cancer metabolism and the mtor pathway in the era of personalized medicine. **Cancer Research**, [S. l.], v. 73, n. 14, p. 4185–4189, 2013. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0512.

MURTHA, Matthew; ESTELLER, Manel. Extraordinary Cancer Epigenomics: Thinking Outside the Classical Coding and Promoter Box. **Trends in Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 572–584, 2016. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.08.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2016.08.004>.

NEBBIOSO, Angela; TAMBARO, Francesco Paolo; DELL’AVERSANA, Carmela; ALTUCCI, Lucia. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1–25, 2018. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007362.

NEILSON, Heather K.; FRIEDENREICH, Christine M.; BROCKTON, Nigel T.; MILLIKAN, Robert C. Physical activity and postmenopausal breast cancer: Proposed biologic mechanisms and areas for future research. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 11–27, 2009. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0756.

NILSSON, Mats I. et al. Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. e0210863, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0210863. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0210863>.

PAHOR, Marco et al. Effect of structured physical activity on prevention of major mobility disability in older adults: The LIFE study randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 311, n. 23, p. 2387–2396, 2014. DOI: 10.1001/jama.2014.5616. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4266388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

PEDERSEN, Katrine S.; GATTO, Francesco; ZERAHN, Bo; NIELSEN, Jens; PEDERSEN, Bente K.; HOJMAN, Pernille; GEHL, Julie. Exercise-mediated lowering of glutamine availability suppresses tumor growth and attenuates muscle wasting. **iScience**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 100978, 2020. DOI: 10.1016/j.isci.2020.100978. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100978>.

PEDERSEN, Line et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 554–562, 2016. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.01.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116300031>.

PEINADO, Héctor et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 883–891, 2012. DOI: 10.1038/nm.2753. Disponível em: <http://www.nature.com.sire.ub.edu/nm/journal/v18/n6/full/nm.2753.html>.

PESTKA, Sidney; KRAUSE, Christopher D.; WALTER, Mark R. **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors**. [s.l.: s.n.], v. 202 DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x. Disponível em: <http://www.videnza.org/wp-content/uploads/World-Cancer-Report-2014.pdf>.

PIGNA, Eva et al. Aerobic Exercise and Pharmacological Treatments Counteract Cachexia by Modulating Autophagy in Colon Cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 26991, 2016. DOI: 10.1038/srep26991. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep26991>.

POL, Edwin Van der; BOING, Anita N.; HARRISON, Paul; STURK, Auguste; NIEUWLAND, Rienk. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 676–705, 2012. DOI: 10.1124/pr.112.005983.

PUPPA, Melissa J.; WHITE, James P.; VELÁZQUEZ, Kandy T.; BALTGALVIS, Kristen A.; SATO, Shuichi; BAYNES, John W.; CARSON, James A. The effect of exercise on IL-6-induced cachexia in the ApcMin/+ mouse. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 117–137, 2012. DOI: 10.1007/s13539-011-0047-1.

PUSAPATI, Raju V. et al. MTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 548–562, 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.02.018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610816300526>.

QU, Le et al. Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 653–668, 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.004.

QUAIL, Daniela F.; JOYCE, Johanna A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013. DOI: 10.1038/nm.3394.

RATAJCZAK, J.; WYSOCZYNSKI, M.; HAYEK, F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M. Z. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1487–1495, 2006. DOI: 10.1038/sj.leu.2404296.

RAVI, Arvind; GURTAN, Allan M.; KUMAR, Madhu S.; BHUTKAR, Arjun; CHIN, Christine; LU, Victoria; LEES, Jacqueline A.; JACKS, Tyler; SHARP, Phillip A. Proliferation and Tumorigenesis of a Murine Sarcoma Cell Line in the Absence of DICER1. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 848–855, 2012. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.04.037. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.037>.

RIAZ, Nadeem et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. **Cell**, [S. l.], v. 171, n. 4, p. 934–949.e15, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.028. Disponível em: [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(17\)31122-4](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(17)31122-4).

ROEBUCK, B. D.; MCCAFFREY, Jennifer; BAUMGARTNER, Karen J. Protective Effects of Voluntary Exercise during the Postinitiation Phase of Pancreatic Carcinogenesis in the Rat. **Cancer Research**, [S. l.], v. 50, n. 21, p. 6811–6816, 1990.

RUNDQVIST, Helene et al. Cytotoxic T-cells mediate exercise-induced reductions in tumor growth. **eLife**, [S. l.], v. 9, p. 1–25, 2020. DOI: 10.7554/eLife.59996. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/59996>.

RUSCH, H. P.; KLINE, B. E. The Effect of Exercise on the Growth of a Mouse Tumor. **Cancer Research**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 116–118, 1944.

SCHADLER, Keri L. et al. Tumor vessel normalization after aerobic exercise enhances chemotherapeutic efficacy. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 40, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.11748. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11748>.

SCHMITZ, Kathryn H.; HOLTZMAN, Jeremy; COURNEYA, Kerry S.; MA, Louise C.; DUVAL, Sue; KANE, Robert. Controlled Physical Activity Trials in Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S. l.], v. 14, n. July, p. 1588–1595, 2005.

SHIGEYASU, Kunitoshi; OKUGAWA, Yoshinaga; TODEN, Shusuke; BOLAND, C. Richard; GOEL, Ajay. Exportin-5 Functions as an oncogene and a potential therapeutic target in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1312–1322, 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1023.

SIMMER, Femke et al. MicroRNA-143 is a putative predictive factor for the response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Oncotarget**, [S. l.], v. 6, n. 26, p. 22996–23007, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.4035.

STRATMANN, Johannes; WANG, Chao Jie; GNOSA, Sebastian; WALLIN, Åsa; HINSELWOOD, David; SUN, Xiao Feng; ZHANG, Hong. Dicer and miRNA in relation to clinicopathological variables in colorectal cancer patients. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 11, 2011. DOI: 10.1186/1471-2407-11-345.

STRAUSS, Bryan E.; PATRÍCIO, Juliana Rotelli; DE CARVALHO, Anna Carolina Vieira; BAJGELMAN, Marcio C. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: A potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 348, n. 4, p. 1411–1418, 2006. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.08.007.

STROBEL STEVENS, Janna; FINE, David; WEBB, Maryla; SARRIF, Awni M.; BRATTAIN, Michael G. Establishment of Mouse Colonic Carcinoma Cell Lines with Different Metastatic Properties. **Cancer Research**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 2142–2146, 1980.

SUN, Hui Lung et al. ERK Activation Globally Downregulates miRNAs through Phosphorylating Exportin-5. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 723–736, 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.001>.

TANG, Weimei et al. The p300/YY1/miR-500a-5p/HDAC2 signalling axis regulates cell proliferation in human colorectal cancer. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41467-018-08225-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-08225-3>.

TENG, Yun et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 14448, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14448. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14448>.

TORRE, Lindsey A.; BRAY, Freddie; SIEGEL, Rebecca L.; FERLAY, Jacques; LORTET-TIEULENT, Joannie; JEMAL, Ahmedin. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015. DOI: 10.3322/caac.21262. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/abstract>.

TURBITT, William J.; XU, Yitong; SOSNOSKI, Donna M.; COLLINS, Shawntawnee D.; MENG, Huicui; MASTRO, Andrea M.; ROGERS, Connie J. Physical activity plus energy restriction prevents 4T1.2 mammary tumor progression, MDSC accumulation, and an immunosuppressive tumor microenvironment. **Cancer Prevention Research**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 493–505, 2019. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0233.

TUTAR, Yusuf. miRNA and cancer; computational and experimental approaches. **Current pharmaceutical biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 429, 2014. DOI: CPB-62061 [pii]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189575>.

UEDA, Ryo et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 26, p. 10746–10751, 2009. a. DOI: 10.1073/pnas.0811817106.

UEDA, Ryo et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 26, p. 10746–10751, 2009. b. DOI: 10.1073/pnas.0811817106. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811817106>.

VALERI, Nicola et al. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 469–483, 2014. a. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.03.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.006>.

VALERI, Nicola et al. MicroRNA-135b Promotes Cancer Progression by Acting as a Downstream Effector of Oncogenic Pathways in Colon Cancer. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 469–483, 2014. b. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.03.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.006>.

VANDERVEEN, Brandon N.; FIX, Dennis K.; COUNTS, Brittany R.; CARSON, James A. The Effect of Wheel Exercise on Functional Indices of Cachexia in Tumor-bearing Mice. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 2320–2330, 2020. DOI: 10.1249/MSS.0000000000002393.

VAZQUEZ, Francisca et al. PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors

with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 287–301, 2013. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.11.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020>.

VINCENZI, Bruno et al. Dicer and Drosha expression and response to Bevacizumab-based therapy in advanced colorectal cancer patients. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 1501–1508, 2013. a. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.014>.

VINCENZI, Bruno et al. Dicer and Drosha expression and response to Bevacizumab-based therapy in advanced colorectal cancer patients. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 1501–1508, 2013. b. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.014.

VOGEL, V. G. Breast cancer prevention: a review of current evidence. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 156–70, 2000. DOI: 10.3322/canjclin.50.3.156. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10901739>.

VULCZAK, Anderson; SOUZA, Anderson De Oliveira; FERRARI, Gustavo Duarte; ELISA, Ana; SEIXAS, Caleiro; PEREIRA-DA-SILVA, Gabriela; ALBERICI, Luciane Carla. Moderate Exercise Modulates Tumor Metabolism of Triple-Negative Breast Cancer. **Cells**, [S. l.], 2020. DOI: 10.3390/cells9030628.

VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA, Petra et al. MicroRNA biogenesis pathway genes are deregulated in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 18, 2019. DOI: 10.3390/ijms20184460.

WANG, Bin et al. Synergetic inhibition of daidzein and regular exercise on breast cancer in bearing-4T1 mice by regulating NK cells and apoptosis pathway. **Life Sciences**, [S. l.], v. 245, p. 117387, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117387. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117387>.

WEI, Spencer C. et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. **Cell**, [S. l.], v. 170, n. 6, p. 1120–1133.e17, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.024. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417308310>.

WENNERBERG, Erik; LHUILLIER, Claire; RYBSTEIN, Marissa D.; DANNENBERG, Kyle; RUDQVIST, Nils-Petter; KOELWYN, Graeme J.; JONES, Lee W.; DEMARIA, Sandra. Exercise reduces immune suppression and breast cancer progression in a preclinical model. **Oncotarget**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 452–461, 2020. DOI: 10.18632/oncotarget.27464.

WISLØFF, Ulrik et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science**, [S. l.], v. 307, n. 5708, p. 418–420, 2005. DOI: 10.1126/science.1108177.

WOLFF, Gretchen; BALKE, Jordan E.; ANDRAS, Ibolya E.; PARK, Minseon; TOBOREK, Michal. Exercise modulates redox-sensitive small GTPase activity in the brain microvasculature in a model of brain metastasis formation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0097033.

World Health Organization Physical Activity. 2017. Disponível em:

http://www.who.int/topics/physical_activity/en/.

ZHANG, Ling-Fei; JIANG, Shuai; LIU, Mo-Fang. MicroRNA regulation and analytical methods in cancer cell metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 74, n. 16, p. 2929–2941, 2017. DOI: 10.1007/s00018-017-2508-y. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-017-2508-y>.

ZHENG, Yong Bin; XIAO, Kuang; XIAO, Gao Chun; TONG, Shi Lun; DING, Yu; WANG, Qiu Shuang; LI, Sheng Bo; HAO, Zhi Nan. MicroRNA-103 promotes tumor growth and metastasis in colorectal cancer by directly targeting LATS2. **Oncology Letters**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 2194–2200, 2016. DOI: 10.3892/ol.2016.4814.

ZHOU, Yong; HUANG, Zufa; WU, Song; ZANG, Xiaofang; LIU, Min; SHI, Jian. MiR-33a is up-regulated in chemoresistant osteosarcoma and promotes osteosarcoma cell resistance to cisplatin by down-regulating TWIST. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 1–12, 2014. DOI: 10.1186/1756-9966-33-12. Disponível em: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-33-12>.

ZHU, Gui fang et al. Mir20a/106a-WTX axis regulates RhoGDIa/CDC42 signaling and colon cancer progression. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41467-018-07998-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07998-x>.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A
LIBERAÇÃO, CONTEÚDO E ORGANOTROPISMO DOS EXOSSOMOS
DERIVADOS DE DIFERENTES EXPLANTES TECIDUAIS**

Gabriel Cardial Tobias

São Paulo
2021

RESUMO

TOBIAS, GABRIEL CARDIAL. **Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a liberação, conteúdo e organotropismo dos exossomos derivados de diferentes explantes teciduais.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2021

O exercício físico aeróbio resulta em uma série de adaptações benéficas ao organismo, tendo como resposta fundamental a melhora da aptidão física. São diversas as evidências que sustentam a importância da manutenção de uma vida fisicamente ativa para a saúde. Indivíduos saudáveis que apresentam baixa capacidade física tendem a apresentar uma menor sobrevivência em comparação com aqueles indivíduos que apresentam alta capacidade física. Recentemente, muitos estudos tem demonstrado que o exercício aumenta o número de exossomos na circulação sanguínea imediatamente após uma sessão aguda de exercício aeróbio. Entretanto, pouco se sabe como o treinamento físico aeróbio afeta a liberação, conteúdo e organotropismo dos exossomos derivados de diferentes órgãos, e como essas alterações estão relacionadas com as adaptações do organismo ao treinamento físico aeróbio crônico. Nós investigamos como o exercício afeta a liberação, o proteoma e o organotropismo dos exossomos de 12 diferentes explantes teciduais e do sangue. Dos marcadores exossomais tradicionais, Hspa8 e Hsp90ab1, Actb, moesin (Msn), Prdx2, Hbb-b1, e Hbb-b2 representaram marcadores pan-exossomais, enquanto que 80 novas proteínas foram identificadas como novos marcadores pan-exossomais de explantes teciduais. Além disso, nós identificamos o proteoma exossomal exclusivo para cada tecido testado. A comparação dos exossomos dos diferentes explantes teciduais dos camundongos treinados identificou proteínas (por exemplo, Cryz11, Pelo e Sec24b) que distinguem do proteoma exossomal dos camundongos sedentários. Por fim, o treinamento físico foi capaz de afetar o consumo dos exossomos dos diferentes explantes teciduais, e que os exossomos derivados do sangue humano parece recapitular o organotropismo dos exossomos murinos.

Palavras-chave: Treinamento físico aeróbio. Exossomos. Explantes teciduais. Proteômica. Biodistribuição.

ABSTRACT

TOBIAS, GABRIEL CARDIAL. Exercise affects release, protein content and organotropism of tissue explant exosomes. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2021

Exercise induces several beneficial adaptations in different tissues impacting on whole body physiology through secretion of diverse molecules such growth factors, cytokines, microRNAs and metabolites. Recently, several studies have reported that exercise increases exosomes number in the blood stream immediately post an exercise bout. However, it is completely unknown what are the sources of the exercise-induced exosomes release in the blood stream. We investigated how chronic exercise affects the release, proteome and organotropism of exosomes derived from 12 different tissue explant exosomes, and blood, and how they affect the inter-organ communication. Among traditional exosomal markers, Hspa8, Hsp90ab1, Actb, moesin (Msn), Prdx2, Hbb-b1, and Hbb-b2 represent pan-exosomal markers, while 80 proteins are novel pan-exosomes markers. Additionally, we identified the unique exosomal proteome for each tissue tested. Comparison of tissue explant exosomes identified proteins (for example, Cryz11, Pelo and Sec24b) that distinguish exercise mice from sedentary mice. Finally, exercise training was able to affect the tissue explant exosome uptake, and that exosomes derived from human blood recapitulate the organotropism of murine exosomes.

Keywords: Aerobic exercise training. Exosomes. Tissue explants exosomes. Proteomics. Biodistribution.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho experimental e protocolo de ultracentrifugação para os exossomos derivados de explantes teciduais..... 128
- Figura 2:** Caracterização dos exossomos derivados de explantes teciduais murinos. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos exossomos derivados dos explantes teciduais.... 129
- Figura 3:** Caracterização dos exossomos derivados de explantes teciduais murinos. Perfil obtido na análise de rastreamento de nanopartícula mostrando a distribuição do tamanho dos exossomos derivados de explantes teciduais. 130
- Figura 4:** Treinamento físico aumenta o número de exossomos na circulação sanguínea após 4 semanas de treinamento. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 131
- Figura 5:** Treinamento físico afeta a liberação dos exossomos derivados dos explantes teciduais mas não o seu tamanho. (A-B): Concentração proteica dos exossomos derivados de explantes teciduais normalizado por grama de tecido e analisado pelo ensaio de BCA. (C-D): Número de exossomos derivados de explantes teciduais normalizado por grama de tecido e analisado pela análise de rastreamento de nanopartículas. (E-F): Tamanho dos exossomos derivados de explantes teciduais analisados pelas análise de rastreamento de nanopartículas. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 134
- Figura 6:** Caracterização do proteoma exossomal dos diferentes explantes teciduais. (A): Número de proteínas exossomais detectadas na espectrometria de massa para cada explante tecidual. (B) Número de proteínas exossomais exclusivas para os camundongos sedentários e para os treinados, considerando-se todos os tecidos. 135
- Figura 7:** Caracterização do Proteoma Exossomal de Explantes Teciduais de Camundongos Sedentários e Treinados. (A): Agrupamento hierárquico do proteoma exossomal dos explantes teciduais. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). (B): Correlação de Pearson para o proteome exossomal dos explantes teciduais. Círculos grandes e mais escuros retratam alta correlação entre as amostras. 138
- Figura 8:** Caracterização dos Marcadores Exossomais de Explantes teciduais Murinos. (A): 11 proteínas consideradas marcadores convencionais de exossomos. (B): 13 novos marcadores de exossomos. Quadrados mais escuros representam maiores valores detectados na espectrometria de massa. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area)..... 139
- Figura 9:** Nova Distribuição de Marcadores Exossomais em diferentes Explantes Teciduais Murinos. (A): 87 novos marcadores exossomais de explantes teciduais murinos Novel tissue

explants exosome markers. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). **(B)**: Correlação de Pearson para o proteome exossomal dos explantes teciduais. Círculos grandes e mais escuros retratam alta correlação entre as amostras. **(C)**: Análise de Gene Ontology para os 87 marcadores exossomais comuns entre os diferentes explantes teciduais listados em **(A)**. 141

Figura 10: Caracterização das Moléculas de Adesão Exossomais nos Explantes Teciduais. **(A)**: Níveis de expressão de diferentes integrinas nos exossomos dos explantes teciduais. **(B)**: Níveis de expressão de diferentes moléculas de adesão não-integrinas nos exossomos dos diferentes explantes teciduais. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). 144

Figura 11: Identificação das Proteínas Exossomais Exclusivas para Cada um dos Diferentes Explantes Teciduais. **(A)**: Heat Map representando as proteínas exossomais exclusivas para cada explante tecidual. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). **(B)**: Número total de proteínas exossomais exclusivas para cada explante tecidual. **(C)**: Número de proteínas exclusivas para cada uma das condições experimentais dos explantes teciduais. 145

Figura 12: Treinamento Físico Induz Assinatura Exossomal Específica. **(A)**: Heat Map representando as proteopinas exossomais entre os camundongos sedentários e treinados. **(B)**: Heat Map mostrando as proteínas exossomais diferencialmente expressas entre os camundongos sedentários e treinados. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). **(C)**: Proteínas exossomais enriquecidas com o treinamento físico encontradas considerando aquelas que foram detectadas em pelo menos >50% das amostras em pelo menos um dos grupos. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). 164

Figura 13: STRING demonstra classificação das proteínas exossomais enriquecidas com o treinamento físico. Proteínas parceiras (esquerda) e Vias associadas encontradas pelo Gene Ontology (direita) para Cryz11, Sec24b, e Pelo. 166

Figura 14: Treinamento Físico Induz Assinatura Exossomal Específica. **(A)**: As 4 principais vias encontradas pelo Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) utilizando o Gene Ontology gene set baseada na comparação entre os exossomos dos explantes teciduais dos camundongos sedentário com dos camundongos treinados. O gráfico as vias enriquecidas considerando-se um FDR < 0.05. **(B)**: Gráfico de enriquecimento gerado pelo GSEA para a via mais enriquecida **(C)**: Proteínas encontradas enriquecidas em todas as vias de sinalização alteradas. 167

Figura 15: Desenho experimental para o ensaio de biodistribuição dos exossomos derivados de explantes teciduais murinos. 170

Figura 16: Treinamento físico afeta o organotropismo dos exossomos derivados de explantes teciduais. Consumo dos exossomos no pulmão **(A)**, fígado **(B)**, baço **(C)**, osso **(D)**, rim **(E)**,

linfonodo (**F**), cérebro (**G**), coração (**H**), tecido adiposo branco (WAT) (**I**), Quadriceps (**J**), e tecido adiposo marrom (BAT) (**K**). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 172

Figura 17: Exossomos derivados do sangue humano é majoritariamente consumido pelo pulmão, fígado e baço. Consumo dos exossomos no pulmão (**A**), fígado (**B**), baço (**C**), osso (**D**), timo (**E**), adrenal (**F**), rim (**G**), coração (**H**), cérebro (**I**). **J:** Imagem dos órgãos inteiros dos exossomos derivados do sangue humano marcados com NIR dye usando o sistema de imagem Odyssey (LI-COR Biosciences). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ 174

1 INTRODUÇÃO

O exercício induz uma série de adaptações benéficas em diferentes tecidos impactando na fisiologia do organismo pela secreção de diversas moléculas tais como fatores de crescimento (PEDERSEN, 2013; RAO et al., 2014; RUAS et al., 2012), citocinas (PEDERSEN, 2013), microRNAs (HOU et al., 2019; SHAH et al., 2017) e metabólitos (AGUDELO et al., 2014; ROBERTS et al., 2014). Recentemente, muitos estudos tem demonstrado que o exercício aumenta o número de exossomos na circulação sanguínea imediatamente após uma sessão aguda de exercício aeróbio em humanos (CHAAR et al., 2011; FRÜHBEIS et al., 2015; WHITHAM et al., 2018), cavalos (DE OLIVEIRA et al., 2020), e ratos (OLIVEIRA et al., 2018). Exossomos são pequenas vesículas de membrana (30–100 nm) contendo biomoléculas funcionais, tais como ácidos nucleicos (DNA, mRNA, microRNA, e outros RNAs não-codificantes), proteínas (receptores, fatores de transcrição, enzimas, proteínas de matriz extracelular), e lipídeos que podem ser horizontalmente transferidos para a célula recipiente (COSTA-SILVA et al., 2015; HOSHINO et al., 2015; PEINADO et al., 2012; QU et al., 2016; WHITHAM et al., 2018). Recentemente, foi demonstrado que exossomos sanguíneos de ratos treinados podem ser consumidos por cardiomiócitos, *in vitro*, e também podem proteger contra os danos causados pela isquemia/reperfusão *in vivo* (HOU et al., 2019). Entretanto, é completamente desconhecido quais são as principais fontes que promovem o aumento do número de exossomos na circulação induzidos pelo exercício. Aqui, nós investigamos como o treinamento físico afeta a liberação, o proteoma e o organotropismo dos exossomos derivados de 12 diferentes explantes teciduais e do sangue, e como eles afetam a fisiologia do organismo.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos prévios demonstram que o exercício aumenta o número de exossomos na circulação sanguínea imediatamente após uma sessão aguda de exercício (CHAAR et al., 2011; FRÜHBEIS et al., 2015; WHITHAM et al., 2018), o que pode promover benefício ao organismo, por exemplo, ocasionando mudanças na massa e função muscular (SAFDAR; SALEEM; TARNOPOLSKY, 2016; SAFDAR; TARNOPOLSKY, 2018), e protegendo contra

os danos causados pela isquemia/reperfusão no miocárdio (HOU et al., 2019). Embora a grande maioria dos estudos sugiram que o músculo esquelético seja a principal fonte pelo aumento do número de exossomos no sangue (CASTAÑO et al., 2020; SAFDAR; SALEEM; TARNOPOLSKY, 2016; SAFDAR; TARNOPOLSKY, 2018; WHITHAM et al., 2018), não há evidências consistentes que sustentem esta teoria. Portanto, se e como o exercício afeta a liberação, o proteoma e organotropismo dos exossomos derivados de diferentes órgãos é totalmente desconhecido.

Nós usamos ultracentrifugações sequenciais para isolar os exossomos de 12 diferentes explantes teciduais, e do sangue, incluindo o coração, pulmão, fígado, rim, timo, linfonodo, baço, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, músculo esquelético, cérebro e osso de camundongos sedentários e treinados (**Figura 1**).

Experimental Design:

Figura 32: Desenho experimental e protocolo de ultracentrifugação para os exossomos derivados de explantes teciduais.

A população de exossomos foi caracterizada pelo seu tamanho (30–150nm) e morfologia por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e por microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente (**Figuras 2 e 3**).

Figura 33: Caracterização dos exossomos derivados de explantes teciduais murinos. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos exossomos derivados dos explantes teciduais.

Figura 34: Caracterização dos exossomos derivados de explantes teciduais murinos. Perfil obtido na análise de rastreamento de nanopartícula mostrando a distribuição do tamanho dos exossomos derivados de explantes teciduais.

Na quarta semana de treinamento houve um aumento na concentração de exossomos na circulação sanguínea (**Figura 4**). Esses resultados são importantes para demonstrar que o nosso protocolo de treinamento físico induziu um aumento da concentração de exossomos circulantes mesmo quando o sangue foi coletado, em repouso, após 48 horas da última sessão de treinamento.

Figura 35: Treinamento físico aumenta o número de exossomos na circulação sanguínea após 4 semanas de treinamento. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para entender quais órgãos seriam os principais responsáveis pelo aumento do número de exossomos na circulação sanguínea induzidos pelo treinamento físico, nós verificamos os resultados gerados pela análise de rastreamento de nanopartículas dos exossomos diferentes explantes teciduais dos camundongos sedentários e treinados. Primeiramente, a análise de concentração proteica por BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific) dos exossomos demonstrou que o pulmão e o osso foram os tecidos nos quais o treinamento físico induziu um aumento na concentração proteica de exossomos, enquanto que o cérebro dos camundongos treinados apresentou uma redução da concentração proteica de exossomos (**Figuras 5A-4B**). Semelhante aos resultados encontrados no ensaio de BCA, a análise de rastreamento de nanopartículas demonstrou que o treinamento físico induziu um aumento no número de exossomos liberados pelo pulmão, sugerindo que o pulmão pode ser o principal responsável pelo aumento do número

de exossomos na circulação sanguínea induzido pelo treinamento físico (**Figuras 5C-5D**). Por fim, não houve nenhuma diferença no tamanho do exossomos dos diferentes exossomos derivados dos explantes teciduais (**Figuras 5E-5F**). Esses resultados sugerem que o pulmão pode ser o principal contribuinte para o aumento do número de exossomos na circulação sanguínea induzido pelo treinamento físico.

Figura 36: *Treinamento físico afeta a liberação dos exossomos derivados dos explantes teciduais mas não o seu tamanho.* (A-B): Concentração proteica dos exossomos derivados de explantes teciduais normalizado por grama de tecido e analisado pelo ensaio de BCA. (C-D): Número de exossomos derivados de explantes teciduais normalizado por grama de tecido e analisado pela análise de rastreamento de nanopartículas. (E-F): Tamanho dos exossomos derivados de explantes teciduais analisados pelas análise de rastreamento de nanopartículas. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

2.1 Caracterização do Proteoma dos Exossomos Derivados de Explantes Teciduais

Embora seja importante entender quais sejam os principais responsáveis pelo aumento do número de exossomos na circulação sanguínea induzido pelo treinamento físico, o conteúdo proteico exossomal é o fator predominante para o organotropismo dos exossomos (COSTA-SILVA et al., 2015; HOSHINO et al., 2015; PEINADO et al., 2012; QU et al., 2016; WHITHAM et al., 2018), e pode determinar algumas das adaptações do organismo ao treinamento físico. Portanto, nós construímos uma base de dados de proteoma exossomal de 12 diferentes explantes teciduais, e do sangue, de camundongos sedentários e treinados. A média para o número de proteínas únicas detectadas nos exossomos foi de 1422 (1176 proteínas para o percentil 25% e 1742 proteínas para o percentil 75%), com uma menor diversidade para os exossomos derivados do linfonodo e do sangue dos camundongos treinados (583 e 701 proteínas, respectivamente) e uma maior diversidade para os exossomos derivados do pulmão e cérebro dos camundongos treinados (1877 e 1978 proteínas, respectivamente) (**Figura 6A**). Por fim, o número de proteínas exossomais exclusivas, considerando todos os explantes teciduais, para os camundongos sedentários foi de 293, enquanto que o número de proteínas exossomais exclusivas para os camundongos treinados foi de 388 (**Figura 6B**).

A

B

Figura 37: Caracterização do proteoma exossomal dos diferentes explantes teciduais. (A): Número de proteínas exossomais detectadas na espectrometria de massa para cada explante tecidual. (B) Número de proteínas exossomais exclusivas para os camundongos sedentários e para os treinados, considerando-se todos os tecidos.

Para avaliar a correlação global entre o proteoma exossomal (**Figure 7A**) dos diferentes explantes teciduais, nós realizamos uma correlação de Pearson comparando o proteoma exossomal de todos os explantes teciduais (**Figure 7B**). As características de cada tecido foi o fator determinante para a assinatura do proteoma exossomal (**Figure 7B**). Em adição aos resultados encontrados na análise de rastreamento de nanopartículas, o proteoma exossomal do sangue se correlaciona melhor com o proteoma exossomal do pulmão, embora tenha sido uma

correlação moderada (sed blood vs sed lung, $r = 0.39$; sed blood vs exer lung, $r = 0.36$; exer blood vs sed lung, $r = 0.31$; exer blood vs exer lung, $r = 0.28$) (**Figura 7B**). Além disso, o proteoma exossomal do sangue difere-se grandemente do proteoma exossomal dos explantes teciduais (**Figura 7B**), sugerindo que a complexidade do proteoma exossomal do sangue pode conduzir para uma divergência para o proteoma exossomal dos explantes teciduais (**Figura 7B**). O proteoma exossomal de órgãos imunes se correlacionam melhores entre si (sed LN vs exer LN, $r = 0.78$; sed LN vs sed thymus, $r = 0.55$; sed LN vs exer thymus, $r = 0.52$; sed LN vs sed spleen, $r = 0.42$; sed LN vs exer spleen, $r = 0.39$; exer LN vs sed thymus, $r = 0.47$; exer LN vs exer thymus, $r = 0.44$; exer LN vs sed spleen, $r = 0.37$). O proteoma exossomal do músculo esquelético se correlaciona melhor com o tecido adiposo marrom (BAT) (**Figure 7B**). Esses resultados sugerem, que em geral, o perfil de proteoma exossomal apresenta-se muito específico ao tipo de tecido ao qual ele é originado, e que o proteoma exossomal do sangue não é a melhor maneira para determinar, com precisão, as principais fontes de liberação de exossomos na corrente sanguínea em condições fisiológicas.

A

B

Figura 38: *Caracterização do Proteoma Exossomal de Explantes Teciduais de Camundongos Sedentários e Treinados.* (A): Agrupamento hierárquico do proteoma exossomal dos explantes teciduais. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). (B): Correlação de Pearson para o proteoma exossomal dos explantes teciduais. Círculos grandes e mais escuros retratam alta correlação entre as amostras.

2.2 Análise do Proteoma Exossomal Identifica Biomarcadores Exossomais Comuns nos Explantes Teciduais Murinos

Para identificar marcadores pan-exossomais onipresentes que possam ajudar no melhor isolamento dos exossomos de diferentes fontes murinas, nós investigamos a frequência de proteínas específicas encontradas nos exossomos dos diferentes explantes teciduais e do sangue. Marcadores exossomais tradicionais (por exemplo, tetraspaninas, proteínas heat shock) foram primeiramente investigadas, e dos 11 marcadores exossomais convencionais analisados (THÉRY et al., 2006), Hspa8 e Hsp90ab1 foram as únicas proteínas exossomais encontradas nos exossomos de todas as amostras (**Figura 8A**). Notavelmente, embora CD63 seja um bem estabelecido marcador exossomal, ela foi detectada em apenas 15 de 26 amostras (**Figura 8A**), sugerindo que os marcadores pan-exossomais usados atualmente para verificar a origem exossomal em cultura de células não pode ser transportado diretamente para os exossomos derivados de explantes teciduais e o sangue. Nós também analisamos 13 novos marcadores exossomais recentemente reportados no estudo de Hoshino *et al.* (2020). Dos 13 marcadores, apenas Actb, moesin (Msn), Prdx2, Hbb-b1, and Hbb-b2 foram detectados em todos os exossomos derivados de explantes teciduais e do sangue (**Figura 8B**).

A

B

Figura 39: Caracterização dos Marcadores Exossomais de Explantes teciduais Murinos. (A): 11 proteínas consideradas marcadores convencionais de exossomos. (B): 13 novos marcadores de exossomos. Quadrados mais escuros representam maiores valores detectados na espectrometria de massa. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area).

Para identificar robustamente as proteínas encontradas em todos os exossomos derivados de explantes teciduais e do sangue, nós procuramos por proteínas que foram

altamente expressas em todos os exossomos derivados dos explantes teciduais e do sangue. Das 4312 proteínas exossomais murinas, 87 coincidiram com esse critério (**Figura 9A**). A análise de correlação de Pearson dessas 87 proteínas demonstrou uma melhor correlação entre as amostras (**Figura 9B**). Além disso, a análise de Gene Ontology (GO) para essas 87 proteínas demonstrou um enriquecimento de vias relacionadas aos exossomos, e que a grande maioria dessas proteínas são proteínas que trafegam através de endossomos além de possíveis marcadores de endocitose/exocitose (**Figura 9C**). Portanto, essas 87 proteínas exossomais podem então representarem um genuíno marcador exossomal de exossomos derivados de explantes teciduais murinos.

Figura 40: Nova Distribuição de Marcadores Exossomais em diferentes Explantes Teciduais Murinos. **(A):** 87 novos marcadores exossomais de explantes teciduais murinos. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). **(B):** Correlação de Pearson para o proteoma exossomal dos explantes teciduais.

Círculos grandes e mais escuros retratam alta correlação entre as amostras. (C): Análise de Gene Ontology para os 87 marcadores exossomais comuns entre os diferentes explantes teciduais listados em (A).

2.3 Caracterização das Moléculas de Adesão Exossomais nos Explantes Teciduais

Integrinas exossomais e moléculas de adesão não-integrinas podem regular o organotropismo dos exossomos (HOSHINO et al., 2015). Nós encontramos uma alta diversidade de integrinas dentre as amostras, e que Itg β 1 e Itg β 2 foram as integrinas melhores representadas nas amostras analisadas. Itg α 5 e Itg α m foram somente detectadas nos exossomos derivados do osso dos camundongos sedentários e treinados, enquanto que a Itg α d foi somente detectada nos exossomos derivados do baço dos camundongos sedentários e treinados (**Figura 10A**). Interessantemente, nenhuma integrina foi detectada nos exossomos derivados do tecido adiposo marrom, músculo esquelético e do fígado, sugerindo que outras moléculas de adesão poderiam determinar seus organotropismo (**Figura 10A**). Diante disso, nós analisamos um painel de moléculas de adesão não-integrinas. Similarmente, nenhuma molécula de adesão não-integrina foi detectada nos exossomos derivados do fígado dos camundongos sedentário e treinados, enquanto que Lagals3bp, Cd34, e Bsg foram detectados nos exossomos derivados do tecido adiposo marrom dos camundongos sedentários e treinados (**Figura 10B**). Mfge8, Col6a1, Col6a2, Thbs4, Comp, Lamb1, e Cd34 foram detectadas nos exossomos derivados do músculo esquelético dos camundongos sedentários e treinados. Somente os exossomos derivados do osso dos camundongos sedentários e treinados expressaram Edil3, enquanto que Col18a1 e Icam2 foram detectadas somente nos exossomos derivados do rim dos camundongos sedentários e treinados. Somente os exossomos derivados do cérebro expressaram Cntn1, enquanto que Icam1 e Cd99 foram detectados apenas nos exossomos derivados dos linfonodos (**Figure 10B**). Juntos, estes resultados sugerem uma alta diversidade na expressão das integrinas e moléculas de adesão nos exossomos dos diferentes explantes teciduais, e que os exossomos derivados do fígado não expressaram nenhuma integrina e molécula de adesão.

A

B

Figura 41: *Caracterização das Moléculas de Adesão Exossomais nos Explantes Teciduais.* (A): Níveis de expressão de diferentes integrinas nos exossomos dos explantes teciduais. (B): Níveis de expressão de diferentes moléculas de adesão não-integrinas nos exossomos dos diferentes explantes teciduais. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area).

2.4 Identificação de Proteínas Exossomais Exclusivas para Cada um dos Diferentes Explantes Teciduais

Para identificar as proteínas exossomais que poderiam ser usadas como marcadores de exossomos tecido-específico, nós primeiramente buscamos identificar aquelas proteínas exossomais detectadas apenas em cada tecido específico. Portanto, nós selecionamos como proteínas exossomais tecido-específica aquelas que foram detectadas nas seguintes condições: detectadas exclusivamente em um tecido específico, seja apenas nos exossomos dos camundongos sedentários, ou apenas nos exossomos dos camundongos treinados, ou em ambos (**Figura 11A**). O número médio de proteínas exossomais tecido-específica foi de 100 (50 proteínas para o percentil 25% e 107 para o percentil 75%), com uma menor diversidade de proteínas para os exossomos derivados do tecido adiposo marrom e músculo esquelético (12 e 32 proteínas, respectivamente) e maior diversidade de proteínas para os exossomos derivados do pulmão e cérebro (118 e 405, respectivamente) (**Figura 11B**). Além disso, o número médio de proteínas exossomais tecido-específica detectadas para cada uma das condições foi de 26,19 (11,5 proteínas para o percentil 25% e 34,25 proteínas para o percentil 75%), com uma menor diversidade de proteínas nos exossomos derivados do tecido adiposo marrom dos camundongos sedentários e nos exossomos derivados do linfonodo dos camundongos treinados (3 e 5 proteínas, respectivamente), e uma maior diversidade nos exossomos derivados do cérebro dos camundongos sedentários e treinados (57 e 106 proteínas, respectivamente) (**Figura 11C**). As **Tabelas S1-S13** mostram as proteínas exossomais tecido-específica.

Figura 42: Identificação das Proteínas Exossomais Exclusivas para Cada um dos Diferentes Explantes Teciduais. (A): Heat Map representando as proteínas exossomais exclusivas para cada explante tecidual. A escala mostra a

intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). **(B)**: Número total de proteínas exossomais exclusivas para cada explante tecidual. **(C)**: Número de proteínas exclusivas para cada uma das condições experimentais dos explantes teciduais.

Além disso, a análise de Gene Ontology revelou uma especificidade de vias enriquecidas para cada exossomo tecido-específico. Por exemplo, exossomos derivados do sangue apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*lipoprotein particles*”; os exossomos derivados do linfonodo apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*T cell receptor*”; os exossomos derivados do baço apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*peptidase activity*”; os exossomos derivados do osso apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*NAD(P)H activity*”; os exossomos derivados do cérebro apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*synaptic process*”; os exossomos derivados do pulmão apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*tigh junction*”; os exossomos derivados do coração apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*cardiac muscle tissue development*”; os exossomos derivados do músculo esquelético apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*contractile fiber*”; os exossomos derivados do tecido adiposo marrom (BAT) apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*mitochondrial respiratory chain complex I*”; e os exossomos derivado do tecido adiposo branco (WAT) apresentam enriquecimento de vias relacionadas à “*Golgi transport complex*” (**Tabelas 1-12**). Interessantemente, todas as vias enriquecidas relacionadas aos exossomos do músculo esquelético foram compartilhadas com as vias enriquecidas dos exossomos derivados do coração (**Tabelas 9-10**). Coletivamente, esses resultados sugerem que os exossomos derivados dos diferentes explantes apresentam características próprias, refletidos no seu conteúdo proteico e processos biológicos associados.

Tabela 7: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do sangue.

Gene Ontology	Fold Enrichment
complement activation, alternative pathway (GO:0006957)	>100
membrane attack complex (GO:0005579)	>100
low-density lipoprotein particle (GO:0034362)	85.92
high-density lipoprotein particle (GO:0034364)	57.28
triglyceride-rich plasma lipoprotein particle (GO:0034385)	57.28
very-low-density lipoprotein particle (GO:0034361)	57.28

lipoprotein particle (GO:1990777)	43.35
plasma lipoprotein particle (GO:0034358)	43.35
protein-lipid complex (GO:0032994)	40.1
acute-phase response (GO:0006953)	38.19
tertiary granule lumen (GO:1904724)	29.16
specific granule lumen (GO:0035580)	25.87
collagen trimer (GO:0005581)	22.28
respirasome (GO:0070469)	20.05
complement activation (GO:0006956)	18.12
humoral immune response (GO:0006959)	8.31
extracellular matrix (GO:0031012)	6.38
immune effector process (GO:0002252)	4.76
regulation of immune response (GO:0050776)	4.58
extracellular space (GO:0005615)	4.49
regulation of immune system process (GO:0002682)	3.76
extracellular region (GO:0005576)	3.47
extracellular exosome (GO:0070062)	3.44
extracellular vesicle (GO:1903561)	3.41
extracellular organelle (GO:0043230)	3.4

Tabela 8: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do timo.

Gene Ontology	Fold Enrichment
positive thymic T cell selection (GO:0045059)	>100
alpha-beta T cell receptor complex (GO:0042105)	>100
T cell receptor binding (GO:0042608)	>100
thymic T cell selection (GO:0045061)	77.8
positive T cell selection (GO:0043368)	75.12
T cell selection (GO:0045058)	59.28
immunological synapse (GO:0001772)	38.9
positive regulation of calcium-mediated signaling (GO:0050850)	38.9
T cell differentiation in thymus (GO:0033077)	29.92
regulation of calcium-mediated signaling (GO:0050848)	22.23
T cell receptor complex (GO:0042101)	20.61
T cell receptor signaling pathway (GO:0050852)	20.52
T cell differentiation (GO:0030217)	17.17
immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway involved in phagocytosis (GO:0002433)	16.14
Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis (GO:0038096)	16.14
Fc receptor mediated stimulatory signaling pathway (GO:0002431)	15.79
Fc-gamma receptor signaling pathway (GO:0038094)	15.79

SH3 domain binding (GO:0017124)	14.25
T cell activation (GO:0042110)	12.86
lymphocyte activation (GO:0046649)	12.77
lymphocyte differentiation (GO:0030098)	12.65
regulation of lymphocyte proliferation (GO:0050670)	12.45
antigen receptor-mediated signaling pathway (GO:0050851)	12.41
regulation of mononuclear cell proliferation (GO:0032944)	12.34
Fc receptor signaling pathway (GO:0038093)	11.72
immune response-activating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002429)	11.68
immune response-activating signal transduction (GO:0002757)	11.68
plasma membrane signaling receptor complex (GO:0098802)	11.49
regulation of leukocyte proliferation (GO:0070663)	11.48
immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002768)	11.46
immune response-regulating signaling pathway (GO:0002764)	11.39
positive regulation of cell-cell adhesion (GO:0022409)	11.11
positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion (GO:1903039)	10.55
small GTPase mediated signal transduction (GO:0007264)	10.45
regulation of T cell activation (GO:0050863)	10.28
activation of immune response (GO:0002253)	10.06
regulation of leukocyte cell-cell adhesion (GO:1903037)	9.63
leukocyte differentiation (GO:0002521)	8.89
regulation of cell-cell adhesion (GO:0022407)	8.62
external side of plasma membrane (GO:0009897)	8.51
positive regulation of immune system process (GO:0002684)	8.27
regulation of lymphocyte activation (GO:0051249)	8.13
positive regulation of immune response (GO:0050778)	8.04
adaptive immune response (GO:0002250)	7.93
regulation of leukocyte activation (GO:0002694)	7.47
membrane raft (GO:0045121)	7.43
membrane microdomain (GO:0098857)	7.41
regulation of immune response (GO:0050776)	7.39
positive regulation of lymphocyte activation (GO:0051251)	7.37
leukocyte migration (GO:0050900)	7.35
positive regulation of leukocyte activation (GO:0002696)	7.32
endocytic vesicle (GO:0030139)	7.3
positive regulation of cell adhesion (GO:0045785)	7.22
positive regulation of cell activation (GO:0050867)	7.14
leukocyte activation (GO:0045321)	7.02
regulation of cell activation (GO:0050865)	7
hemopoiesis (GO:0030097)	6.89
receptor complex (GO:0043235)	6.81
side of membrane (GO:0098552)	6.65
plasma membrane protein complex (GO:0098797)	6.46

regulation of immune system process (GO:0002682)	6.38
hematopoietic or lymphoid organ development (GO:0048534)	6.37
cell activation (GO:0001775)	6.36
immune system development (GO:0002520)	6.03
leukocyte activation involved in immune response (GO:0002366)	6
cell activation involved in immune response (GO:0002263)	5.97
immune effector process (GO:0002252)	5.68
regulation of cell adhesion (GO:0030155)	5.61
vesicle membrane (GO:0012506)	4.98
immune response (GO:0006955)	4.78
cell surface (GO:0009986)	4.61
immune system process (GO:0002376)	4.46
intrinsic component of plasma membrane (GO:0031226)	3.95
integral component of plasma membrane (GO:0005887)	3.76
membrane protein complex (GO:0098796)	3.7
positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	3.51
intracellular signal transduction (GO:0035556)	3.32
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	3.31
regulation of response to stimulus (GO:0048583)	3.12
extracellular exosome (GO:0070062)	3.12
cell surface receptor signaling pathway (GO:0007166)	3.09
extracellular vesicle (GO:1903561)	3.08
extracellular organelle (GO:0043230)	3.08
interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	3.07
identical protein binding (GO:0042802)	2.98
vesicle (GO:0031982)	2.92
cytoplasmic vesicle (GO:0031410)	2.92
intracellular vesicle (GO:0097708)	2.91
regulation of localization (GO:0032879)	2.8
cell periphery (GO:0071944)	2.67
plasma membrane (GO:0005886)	2.67
localization (GO:0051179)	2.12
signal transduction (GO:0007165)	2.11
positive regulation of biological process (GO:0048518)	2.08
cell communication (GO:0007154)	2.05
signaling (GO:0023052)	2.03
cellular response to stimulus (GO:0051716)	1.92
response to stimulus (GO:0050896)	1.9
intrinsic component of membrane (GO:0031224)	1.88
membrane (GO:0016020)	1.81
regulation of biological process (GO:0050789)	1.56
regulation of cellular process (GO:0050794)	1.56
biological regulation (GO:0065007)	1.48

protein binding (GO:0005515)	1.34
------------------------------	------

Tabela 9: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do baço.

Gene Ontology	Fold Enrichment
metallocarboxypeptidase activity (GO:0004181)	35.19
carboxypeptidase activity (GO:0004180)	29.99
metalloexopeptidase activity (GO:0008235)	20.3
exopeptidase activity (GO:0008238)	19.25
peptidase activity (GO:0008233)	4.81
hydrolase activity (GO:0016787)	2.99
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	2.33
catalytic activity (GO:0003824)	1.99
nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	1.82
primary metabolic process (GO:0044238)	1.81
metabolic process (GO:0008152)	1.78
organic substance metabolic process (GO:0071704)	1.78

Tabela 10: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do osso.

Gene Ontology	Fold Enrichment
NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity (GO:0003955)	26.17
collagen binding (GO:0005518)	22.17
oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor (GO:0016655)	20.93
respiratory chain complex (GO:0098803)	14.95
oxidoreductase complex (GO:1990204)	13.34
endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (GO:0005793)	13.03
bone development (GO:0060348)	11.9
inner mitochondrial membrane protein complex (GO:0098800)	10.47
ossification (GO:0001503)	9.48
carbohydrate binding (GO:0030246)	7.31
skeletal system development (GO:0001501)	6.68
extracellular matrix (GO:0031012)	6.66
collagen-containing extracellular matrix (GO:0062023)	6.52
bounding membrane of organelle (GO:0098588)	2.66
extracellular vesicle (GO:1903561)	2.61
extracellular organelle (GO:0043230)	2.61
organelle membrane (GO:0031090)	2.41

vesicle (GO:0031982)	2.36
extracellular space (GO:0005615)	2.3
extracellular region (GO:0005576)	2.11
endomembrane system (GO:0012505)	2.1
membrane (GO:0016020)	1.57

Tabela 11: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do fígado.

Gene Ontology	Fold Enrichment
tryptophan catabolic process to kynurenine (GO:0019441)	>100
'de novo' NAD biosynthetic process (GO:0034627)	>100
'de novo' NAD biosynthetic process from tryptophan (GO:0034354)	>100
tryptophan catabolic process (GO:0006569)	99.29
indole-containing compound catabolic process (GO:0042436)	99.29
indolalkylamine catabolic process (GO:0046218)	99.29
tryptophan metabolic process (GO:0006568)	82.74
indolalkylamine metabolic process (GO:0006586)	58.41
amine catabolic process (GO:0009310)	56.42
cellular biogenic amine catabolic process (GO:0042402)	56.42
aromatic amino acid family catabolic process (GO:0009074)	53.19
indole-containing compound metabolic process (GO:0042430)	43.17
benzene-containing compound metabolic process (GO:0042537)	39.72
aromatic amino acid family metabolic process (GO:0009072)	37.23
microbody lumen (GO:0031907)	25.68
peroxisomal matrix (GO:0005782)	25.68
cellular biogenic amine metabolic process (GO:0006576)	25.24
cellular amine metabolic process (GO:0044106)	24.82
amine metabolic process (GO:0009308)	21.9
alpha-amino acid catabolic process (GO:1901606)	21.28
cellular amino acid catabolic process (GO:0009063)	18.02
dicarboxylic acid metabolic process (GO:0043648)	15.84
acyl-CoA metabolic process (GO:0006637)	15.04
thioester metabolic process (GO:0035383)	15.04
organic acid catabolic process (GO:0016054)	13.02
carboxylic acid catabolic process (GO:0046395)	13.02
purine nucleoside bisphosphate metabolic process (GO:0034032)	12.87
ribonucleoside bisphosphate metabolic process (GO:0033875)	12.87
nucleoside bisphosphate metabolic process (GO:0033865)	12.87
alpha-amino acid metabolic process (GO:1901605)	11.99
microbody (GO:0042579)	11.58
peroxisome (GO:0005777)	11.58
vitamin binding (GO:0019842)	11.58
small molecule catabolic process (GO:0044282)	11.44

cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	9.26
aromatic compound catabolic process (GO:0019439)	9.23
organic cyclic compound catabolic process (GO:1901361)	9.12
cellular nitrogen compound catabolic process (GO:0044270)	9.01
carboxylic acid biosynthetic process (GO:0046394)	8.7
organic acid biosynthetic process (GO:0016053)	8.67
heterocycle catabolic process (GO:0046700)	8.46
purine-containing compound metabolic process (GO:0072521)	7.92
nucleobase-containing small molecule metabolic process (GO:0055086)	7.54
nucleoside phosphate metabolic process (GO:0006753)	7.22
nucleotide metabolic process (GO:0009117)	6.85
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	6.62
monocarboxylic acid metabolic process (GO:0032787)	6.41
carboxylic acid metabolic process (GO:0019752)	6.32
small molecule biosynthetic process (GO:0044283)	6.31
organic acid metabolic process (GO:0006082)	6.1
oxoacid metabolic process (GO:0043436)	5.73
mitochondrial matrix (GO:0005759)	5.65
oxidoreductase activity (GO:0016491)	5.44
organophosphate metabolic process (GO:0019637)	5.22
oxidation-reduction process (GO:0055114)	5.12
small molecule metabolic process (GO:0044281)	4.97
organonitrogen compound catabolic process (GO:1901565)	4.33
organic substance catabolic process (GO:1901575)	4.18
cellular catabolic process (GO:0044248)	3.93
transition metal ion binding (GO:0046914)	3.77
catabolic process (GO:0009056)	3.66
mitochondrion (GO:0005739)	3.6
organic cyclic compound metabolic process (GO:1901360)	2.62
cellular biosynthetic process (GO:0044249)	2.57
heterocycle metabolic process (GO:0046483)	2.54
cellular aromatic compound metabolic process (GO:0006725)	2.49
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	2.48
organic substance biosynthetic process (GO:1901576)	2.48
biosynthetic process (GO:0009058)	2.43
catalytic activity (GO:0003824)	2.38
cytosol (GO:0005829)	2.29
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	1.96
cellular metabolic process (GO:0044237)	1.95
organic substance metabolic process (GO:0071704)	1.86
metabolic process (GO:0008152)	1.85
primary metabolic process (GO:0044238)	1.8
nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	1.79

cytoplasm (GO:0005737)	1.54
regulation of cellular process (GO:0050794)	0.52
membrane (GO:0016020)	0.5
integral component of membrane (GO:0016021)	0.3
intrinsic component of membrane (GO:0031224)	0.29

Tabela 12: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do pulmão.

Gene Ontology	Fold Enrichment
apicolateral plasma membrane (GO:0016327)	39.55
bicellular tight junction assembly (GO:0070830)	22.67
tight junction assembly (GO:0120192)	21.92
tight junction organization (GO:0120193)	21.21
apical junction assembly (GO:0043297)	19.63
bicellular tight junction (GO:0005923)	17.08
tight junction (GO:0070160)	16.14
apical junction complex (GO:0043296)	15.65
ruffle membrane (GO:0032587)	13.7
cell-cell junction assembly (GO:0007043)	11.83
leading edge membrane (GO:0031256)	9.5
cell-cell junction organization (GO:0045216)	9.04
ruffle (GO:0001726)	8.3
apical plasma membrane (GO:0016324)	7.68
cell junction assembly (GO:0034329)	7.41
apical part of cell (GO:0045177)	6.89
cell-cell junction (GO:0005911)	6.78
cell projection membrane (GO:0031253)	6.44
late endosome (GO:0005770)	6.06
cell leading edge (GO:0031252)	5.69
anchoring junction (GO:0070161)	4.95
cell adhesion molecule binding (GO:0050839)	4.51
plasma membrane region (GO:0098590)	4.44
extracellular vesicle (GO:1903561)	3.9
extracellular organelle (GO:0043230)	3.9
extracellular exosome (GO:0070062)	3.85
vesicle (GO:0031982)	3
extracellular space (GO:0005615)	2.94
intrinsic component of plasma membrane (GO:0031226)	2.71
integral component of plasma membrane (GO:0005887)	2.61
extracellular region (GO:0005576)	2.48
cytoplasmic vesicle (GO:0031410)	2.45
intracellular vesicle (GO:0097708)	2.45
plasma membrane (GO:0005886)	2.32

regulation of localization (GO:0032879)	2.3
cell periphery (GO:0071944)	2.27
transport (GO:0006810)	1.97
establishment of localization (GO:0051234)	1.95
localization (GO:0051179)	1.89
membrane (GO:0016020)	1.62
membrane-bounded organelle (GO:0043227)	1.32

Tabela 13: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do cérebro.

Gene Ontology	Fold Enrichment
clathrin-sculpted vesicle (GO:0060198)	21.45
integral component of synaptic vesicle membrane (GO:0030285)	16.47
glutamate secretion (GO:0014047)	14.95
mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex (GO:0005847)	12.87
dendritic spine development (GO:0060996)	12.43
presynaptic endocytosis (GO:0140238)	11.56
synaptic vesicle endocytosis (GO:0048488)	11.56
intrinsic component of synaptic vesicle membrane (GO:0098563)	10.84
long-term synaptic potentiation (GO:0060291)	10.73
synaptic vesicle recycling (GO:0036465)	9.94
regulation of dendritic spine morphogenesis (GO:0061001)	9.86
synaptic vesicle cycle (GO:0099504)	9.74
acidic amino acid transport (GO:0015800)	9.71
positive regulation of dendritic spine development (GO:0060999)	9.58
synaptic vesicle exocytosis (GO:0016079)	9.53
vesicle-mediated transport in synapse (GO:0099003)	9.32
exocytic vesicle membrane (GO:0099501)	9.19
synaptic vesicle membrane (GO:0030672)	9.19
regulation of dendritic spine development (GO:0060998)	9.13
neurotransmitter secretion (GO:0007269)	9.12
signal release from synapse (GO:0099643)	9.12
associative learning (GO:0008306)	8.79
neurotransmitter transport (GO:0006836)	8.76
cellular response to nerve growth factor stimulus (GO:1990090)	8.74
visual behavior (GO:0007632)	8.74
response to nerve growth factor (GO:1990089)	8.27
synaptic vesicle (GO:0008021)	7.67
dendritic spine (GO:0043197)	7.31
neuron spine (GO:0044309)	7.24
exocytic vesicle (GO:0070382)	7
small nuclear ribonucleoprotein complex (GO:0030532)	6.81

U2-type spliceosomal complex (GO:0005684)	6.5
dendrite development (GO:0016358)	6.49
regulation of dendrite development (GO:0050773)	6.44
regulation of axonogenesis (GO:0050770)	6.28
asymmetric synapse (GO:0032279)	6.25
neuron to neuron synapse (GO:0098984)	6.22
postsynaptic density (GO:0014069)	6.2
positive regulation of neuron projection development (GO:0010976)	5.98
regulation of neurotransmitter levels (GO:0001505)	5.96
positive regulation of synaptic transmission (GO:0050806)	5.76
postsynaptic specialization (GO:0099572)	5.76
transport vesicle membrane (GO:0030658)	5.75
regulation of synaptic plasticity (GO:0048167)	5.63
mRNA splicing, via spliceosome (GO:0000398)	5.42
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile (GO:0000377)	5.42
learning (GO:0007612)	5.42
RNA splicing, via transesterification reactions (GO:0000375)	5.37
signal release (GO:0023061)	5.18
regulation of neuron projection development (GO:0010975)	4.99
spliceosomal complex (GO:0005681)	4.99
postsynapse (GO:0098794)	4.96
GTPase activator activity (GO:0005096)	4.95
glutamatergic synapse (GO:0098978)	4.95
guanyl-nucleotide exchange factor activity (GO:0005085)	4.85
transport vesicle (GO:0030133)	4.8
modulation of chemical synaptic transmission (GO:0050804)	4.71
regulation of trans-synaptic signaling (GO:0099177)	4.7
presynapse (GO:0098793)	4.7
regulation of mRNA processing (GO:0050684)	4.68
regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)	4.68
nucleoside-triphosphatase regulator activity (GO:0060589)	4.64
Rho GTPase binding (GO:0017048)	4.62
GTPase regulator activity (GO:0030695)	4.62
trans-synaptic signaling (GO:0099537)	4.59
synaptic signaling (GO:0099536)	4.56
chemical synaptic transmission (GO:0007268)	4.53
anterograde trans-synaptic signaling (GO:0098916)	4.53
RNA splicing (GO:0008380)	4.39
calmodulin binding (GO:0005516)	4.33
regulation of synapse structure or activity (GO:0050803)	4.31
protein threonine kinase activity (GO:0106311)	4.31
protein serine kinase activity (GO:0106310)	4.31

dendrite (GO:0030425)	4.24
dendritic tree (GO:0097447)	4.23
positive regulation of GTPase activity (GO:0043547)	4.06
synapse (GO:0045202)	4.01
somatodendritic compartment (GO:0036477)	4.01
enzyme activator activity (GO:0008047)	4
growth cone (GO:0030426)	3.98
distal axon (GO:0150034)	3.97
microtubule binding (GO:0008017)	3.96
regulation of GTPase activity (GO:0043087)	3.9
mRNA processing (GO:0006397)	3.79
positive regulation of cell projection organization (GO:0031346)	3.76
regulation of plasma membrane bounded cell projection organization (GO:0120035)	3.76
nuclear speck (GO:0016607)	3.7
learning or memory (GO:0007611)	3.69
tubulin binding (GO:0015631)	3.68
regulation of cell projection organization (GO:0031344)	3.67
small GTPase mediated signal transduction (GO:0007264)	3.65
GTPase binding (GO:0051020)	3.64
neuronal cell body (GO:0043025)	3.56
cell body (GO:0044297)	3.56
regulation of supramolecular fiber organization (GO:1902903)	3.53
neuron projection morphogenesis (GO:0048812)	3.49
small GTPase binding (GO:0031267)	3.49
Ras GTPase binding (GO:0017016)	3.49
plasma membrane bounded cell projection morphogenesis (GO:0120039)	3.46
cell projection morphogenesis (GO:0048858)	3.43
mRNA binding (GO:0003729)	3.42
neuron projection development (GO:0031175)	3.41
axon (GO:0030424)	3.37
actin cytoskeleton organization (GO:0030036)	3.36
cell part morphogenesis (GO:0032990)	3.29
regulation of neurogenesis (GO:0050767)	3.29
microtubule (GO:0005874)	3.27
mRNA metabolic process (GO:0016071)	3.24
neuron projection (GO:0043005)	3.19
regulation of cytoskeleton organization (GO:0051493)	3.18
protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674)	3.16
neuron development (GO:0048666)	3.15
actin filament-based process (GO:0030029)	3.11
cellular component morphogenesis (GO:0032989)	3.09
regulation of nervous system development (GO:0051960)	3.02
regulation of vesicle-mediated transport (GO:0060627)	2.99

cell junction (GO:0030054)	2.98
brain development (GO:0007420)	2.94
cell morphogenesis involved in neuron differentiation (GO:0048667)	2.94
phospholipid binding (GO:0005543)	2.91
protein kinase activity (GO:0004672)	2.9
behavior (GO:0007610)	2.86
neuron differentiation (GO:0030182)	2.84
head development (GO:0060322)	2.84
cell junction organization (GO:0034330)	2.83
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor (GO:0016773)	2.83
ribonucleoprotein complex (GO:1990904)	2.79
positive regulation of hydrolase activity (GO:0051345)	2.77
kinase activity (GO:0016301)	2.73
cytoskeleton organization (GO:0007010)	2.69
protein domain specific binding (GO:0019904)	2.69
negative regulation of cellular component organization (GO:0051129)	2.68
central nervous system development (GO:0007417)	2.68
nervous system development (GO:0007399)	2.66
generation of neurons (GO:0048699)	2.66
cell morphogenesis (GO:0000902)	2.64
plasma membrane bounded cell projection organization (GO:0120036)	2.63
cell projection organization (GO:0030030)	2.57
neurogenesis (GO:0022008)	2.57
RNA processing (GO:0006396)	2.55
lipid binding (GO:0008289)	2.54
vesicle membrane (GO:0012506)	2.53
nuclear body (GO:0016604)	2.52
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups (GO:0016772)	2.47
cytoplasmic vesicle membrane (GO:0030659)	2.47
perinuclear region of cytoplasm (GO:0048471)	2.46
protein phosphorylation (GO:0006468)	2.45
plasma membrane bounded cell projection (GO:0120025)	2.44
cell projection (GO:0042995)	2.43
cytoskeletal protein binding (GO:0008092)	2.42
positive regulation of catalytic activity (GO:0043085)	2.4
regulation of cellular component biogenesis (GO:0044087)	2.39
enzyme regulator activity (GO:0030234)	2.37
regulation of cellular component organization (GO:0051128)	2.36
cell-cell signaling (GO:0007267)	2.29
regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)	2.26
regulation of organelle organization (GO:0033043)	2.21
intracellular signal transduction (GO:0035556)	2.19
cell development (GO:0048468)	2.15

positive regulation of molecular function (GO:0044093)	2.13
positive regulation of cellular component organization (GO:0051130)	2.13
secretory vesicle (GO:0099503)	2.09
RNA binding (GO:0003723)	2.07
regulation of hydrolase activity (GO:0051336)	2.06
phosphorylation (GO:0016310)	2.02
RNA metabolic process (GO:0016070)	1.94
enzyme binding (GO:0019899)	1.92
supramolecular complex (GO:0099080)	1.92
regulation of transport (GO:0051049)	1.91
adenyl ribonucleotide binding (GO:0032559)	1.9
adenyl nucleotide binding (GO:0030554)	1.88
ribonucleotide binding (GO:0032553)	1.88
ATP binding (GO:0005524)	1.87
purine ribonucleotide binding (GO:0032555)	1.87
anion binding (GO:0043168)	1.87
purine ribonucleoside triphosphate binding (GO:0035639)	1.86
purine nucleotide binding (GO:0017076)	1.85
phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)	1.83
cytosol (GO:0005829)	1.81
phosphorus metabolic process (GO:0006793)	1.8
protein localization (GO:0008104)	1.8
regulation of catalytic activity (GO:0050790)	1.79
cytoskeleton (GO:0005856)	1.78
small molecule binding (GO:0036094)	1.75
cellular localization (GO:0051641)	1.73
nucleotide binding (GO:0000166)	1.72
nucleoside phosphate binding (GO:1901265)	1.72
cytoplasmic vesicle (GO:0031410)	1.72
intracellular vesicle (GO:0097708)	1.72
regulation of biological quality (GO:0065008)	1.71
regulation of molecular function (GO:0065009)	1.71
carbohydrate derivative binding (GO:0097367)	1.69
regulation of localization (GO:0032879)	1.68
regulation of cell communication (GO:0010646)	1.66
regulation of signaling (GO:0023051)	1.66
system development (GO:0048731)	1.62
organelle organization (GO:0006996)	1.61
macromolecule modification (GO:0043412)	1.6
cellular component organization (GO:0016043)	1.58
multicellular organism development (GO:0007275)	1.56
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	1.56
cell communication (GO:0007154)	1.52

signaling (GO:0023052)	1.51
anatomical structure development (GO:0048856)	1.51
developmental process (GO:0032502)	1.49
nucleoplasm (GO:0005654)	1.47
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	1.4
nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	1.38
primary metabolic process (GO:0044238)	1.38
cytoplasm (GO:0005737)	1.36
cellular metabolic process (GO:0044237)	1.35
organic substance metabolic process (GO:0071704)	1.32
protein binding (GO:0005515)	1.29
intracellular anatomical structure (GO:0005622)	1.28
regulation of cellular process (GO:0050794)	1.23
biological regulation (GO:0065007)	1.22
regulation of biological process (GO:0050789)	1.22
cellular process (GO:0009987)	1.22
intracellular organelle (GO:0043229)	1.22
binding (GO:0005488)	1.2
organelle (GO:0043226)	1.2
biological_process (GO:0008150)	1.12
molecular_function (GO:0003674)	1.11
cellular anatomical entity (GO:0110165)	1.07
cellular_component (GO:0005575)	1.07
intrinsic component of membrane (GO:0031224)	0.61
integral component of membrane (GO:0016021)	0.56
extracellular space (GO:0005615)	0.52
extracellular region (GO:0005576)	0.52
DNA-binding transcription factor activity (GO:0003700)	0.28
DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific (GO:0000981)	0.26
molecular transducer activity (GO:0060089)	0.24
signaling receptor activity (GO:0038023)	0.24
transmembrane signaling receptor activity (GO:0004888)	0.23
G protein-coupled receptor activity (GO:0004930)	0.06

Tabela 14: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do rim.

Gene Ontology	Fold Enrichment
carbohydrate:cation symporter activity (GO:0005402)	52.65
monosaccharide transmembrane transporter activity (GO:0015145)	36.63
sugar transmembrane transporter activity (GO:0051119)	33.7
Golgi lumen (GO:0005796)	12.39
heparin binding (GO:0008201)	11.28
growth factor binding (GO:0019838)	10.68

extracellular matrix structural constituent (GO:0005201)	9.97
glycosaminoglycan binding (GO:0005539)	9.08
collagen-containing extracellular matrix (GO:0062023)	8.44
apical plasma membrane (GO:0016324)	8.03
sulfur compound binding (GO:1901681)	7.98
apical part of cell (GO:0045177)	6.76
extracellular matrix (GO:0031012)	6.7
calcium ion binding (GO:0005509)	5.17
endopeptidase activity (GO:0004175)	5
peptidase activity (GO:0008233)	4.8
cell adhesion (GO:0007155)	4.67
biological adhesion (GO:0022610)	4.64
tube morphogenesis (GO:0035239)	4.44
plasma membrane region (GO:0098590)	4.12
extracellular exosome (GO:0070062)	4.02
regulation of cell migration (GO:0030334)	4.01
extracellular vesicle (GO:1903561)	3.98
extracellular organelle (GO:0043230)	3.97
tube development (GO:0035295)	3.92
anatomical structure formation involved in morphogenesis (GO:0048646)	3.79
cell surface (GO:0009986)	3.78
anchoring junction (GO:0070161)	3.78
regulation of cell motility (GO:2000145)	3.75
cell migration (GO:0016477)	3.66
regulation of locomotion (GO:0040012)	3.59
localization of cell (GO:0051674)	3.41
cell motility (GO:0048870)	3.41
small molecule metabolic process (GO:0044281)	3.13
extracellular space (GO:0005615)	3.11
extracellular region (GO:0005576)	2.92
vesicle (GO:0031982)	2.51
metal ion binding (GO:0046872)	1.96
plasma membrane (GO:0005886)	1.95
cation binding (GO:0043169)	1.93
cell periphery (GO:0071944)	1.91
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	1.82
catalytic activity (GO:0003824)	1.8
ion binding (GO:0043167)	1.74
nucleus (GO:0005634)	0.44
nucleic acid binding (GO:0003676)	0.16

Tabela 15: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do coração.

Gene Ontology	Fold Enrichment
cardiac myofibril (GO:0097512)	100
ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055010)	46.21
ventricular cardiac muscle tissue development (GO:0003229)	40.33
cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055008)	36.36
muscle tissue morphogenesis (GO:0060415)	30.81
cardiac ventricle morphogenesis (GO:0003208)	30.81
muscle organ morphogenesis (GO:0048644)	28.44
cardiac chamber morphogenesis (GO:0003206)	20.8
cardiac muscle tissue development (GO:0048738)	19.78
sarcomere (GO:0030017)	17.23
cardiac chamber development (GO:0003205)	15.57
myofibril (GO:0030016)	15.57
contractile fiber (GO:0043292)	14.91
heart morphogenesis (GO:0003007)	12.73
striated muscle tissue development (GO:0014706)	11.21
muscle tissue development (GO:0060537)	10.64

Tabela 16: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do músculo esquelético.

Gene Ontology	Fold Enrichment
sarcomere (GO:0030017)	16.87
myofibril (GO:0030016)	15.24
contractile fiber (GO:0043292)	14.6

Tabela 17: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do tecido adiposo marrom.

Gene Ontology	Fold Enrichment
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone (GO:0006120)	>100
NADH dehydrogenase activity (GO:0003954)	>100
NADH dehydrogenase (quinone) activity (GO:0050136)	>100
NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)	>100
NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity (GO:0003955)	>100
respiratory chain complex I (GO:0045271)	>100
NADH dehydrogenase complex (GO:0030964)	>100
mitochondrial respiratory chain complex I (GO:0005747)	>100
mitochondrial respirasome (GO:0005746)	97.62
oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor (GO:0016655)	86.88
respirasome (GO:0070469)	86.88

respiratory chain complex (GO:0098803)	82.74
mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775)	78.09
ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042773)	77.23
oxidative phosphorylation (GO:0006119)	71.8
respiratory electron transport chain (GO:0022904)	63.18
electron transport chain (GO:0022900)	48.81
inner mitochondrial membrane protein complex (GO:0098800)	48.27
cellular respiration (GO:0045333)	43.44
ATP metabolic process (GO:0046034)	41.37
mitochondrial protein complex (GO:0098798)	25.93
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	21.04
mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	17.41
organelle inner membrane (GO:0019866)	15.51

Tabela 18: Vias enriquecidas pelo proteoma exossomal exclusivo do tecido adiposo branco.

Gene Ontology	Fold Enrichment
Golgi transport complex (GO:0017119)	81.77
vesicle tethering complex (GO:0099023)	32.71
phagophore assembly site (GO:0000407)	30.66
trans-Golgi network membrane (GO:0032588)	17.89
Golgi organization (GO:0007030)	12.53
endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport (GO:0006888)	11.15
trans-Golgi network (GO:0005802)	9.73
Golgi vesicle transport (GO:0048193)	6.75
protein transport (GO:0015031)	3.41
organelle subcompartment (GO:0031984)	3.41
intracellular transport (GO:0046907)	3.38
peptide transport (GO:0015833)	3.35
amide transport (GO:0042886)	3.27
establishment of protein localization (GO:0045184)	3.23
macromolecule localization (GO:0033036)	2.87
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	2.86
bounding membrane of organelle (GO:0098588)	2.82
organic substance transport (GO:0071702)	2.75
endoplasmic reticulum (GO:0005783)	2.69
protein localization (GO:0008104)	2.68
organelle membrane (GO:0031090)	2.42
endomembrane system (GO:0012505)	2.37
cytoplasm (GO:0005737)	1.58
intracellular anatomical structure (GO:0005622)	1.32

2.5 Análise do Proteoma Exossomal Derivados De Explantes Teciduais Identifica uma Assinatura Associada ao Exercício

Uma vez que foram identificadas as proteínas exossomais exclusivas para cada explante tecidual, nós verificamos se comparando os proteoma exossomal dos camundongos treinados com o dos camundongos sedentários poderia haver uma assinatura global determinada pelo exercício (**Figura 12A**). Nós buscamos por proteínas presentes em pelo menos $\geq 50\%$ das amostras presentes nos exossomos dos camundongos sedentários ou nos exossomos dos camundongos treinados, e desses, nós selecionamos aqueles que apresentaram um aumento de pelo menos 10-fold ou com uma grande diferença entre os grupos com um *false discovery rate* (FDR) < 0.05 (**Figura 12B**). Baseado nesse critério, 3 proteínas exossomais foram identificadas como proteínas enriquecidas pelo exercício (**Figura 12C**): *Quinone oxidoreductase-like protein 1* (Cryz11), *Protein pelota homolog* (Pelo), e *Sec24-related gene family, member B* (*S. cerevisiae*) (Sec24b) (**Figura 12C**).

Figura 43: *Treinamento Físico Induz Assinatura Exossomal Específica.* (A): Heat Map representando as proteínas exossomais entre os camundongos sedentários e treinados. (B): Heat Map mostrando as proteínas exossomais diferencialmente expressas entre os camundongos sedentários e treinados. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area). (C): Proteínas exossomais enriquecidas com o treinamento físico encontradas considerando aquelas que foram detectadas em pelo menos >50% das amostras em pelo menos um dos grupos. A escala mostra a intensidade da proteína detectada na espectrometria de massa (area).

A classificação das vias relacionadas à essas 3 proteínas usando a plataforma STRING (<https://string-db.org/>) revelou que Cryz11 está envolvida em diferentes processos catabólicos (por exemplo, *drug catabolic process*, *neurotransmitter catabolic process*, *phenol-containing compound metabolic process*, e *dopamine catabolic process*); Sec24b está envolvida em processos relacionados à COPII (por exemplo, *COPII-coated vesicle budding*, *COPII vesicle coating*, *COPII-coated vesicle cargo loading*, *protein transport*, e *vesicle-mediated transport*); e Pelo está envolvida em tradução proteica (por exemplo, *translation*, *translational initiation*, *cytoplasmic translation*, *ribosome biogenesis*, e *posttranscriptional regulation of gene expression* (**Figura 13**).

Figura 44: *STRING* demonstra classificação das proteínas exossomais enriquecidas com o treinamento físico. Proteínas parceiras (esquerda) e Vias associadas encontradas pelo Gene Ontology (direita) para Cryz11, Sec24b, e Pelo.

Além disso, a análise de Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (SUBRAMANIAN; TAMAYO; MOOTHA, 2014) revelou que o exercício induziu o enriquecimento de vias relacionadas a tradução de proteínas nos exossomos como, por exemplo, *translation factor activity RNA binding*, *translation initiation factor activity*, *translation regulator activity nucleic*

acid binding, e translation regulator activity, e que proteínas Eif estavam enriquecidas nessas vias (Figuras 14A-14C).

Figura 45: *Treinamento Físico Induz Assinatura Exossomal Específica.* (A): As 4 principais vias encontradas pelo Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) utilizando o Gene Ontology gene set baseada na comparação entre os exossomos dos explantes teciduais dos camundongos sedentário com dos camundongos treinados. O gráfico as vias enriquecidas considerando-se um FDR < 0.05. (B): Gráfico de enriquecimento gerado pelo GSEA para a via mais enriquecida (C): Proteínas encontradas enriquecidas em todas as vias de sinalização alteradas.

2.6 O treinamento físico afeta o organotropismo dos exossomos derivados de explantes teciduais

Para avaliar se os exossomos derivados dos diferentes explantes teciduais colonizam órgãos específicos, e se o treinamento físico poderia mudar essa colonização, nós injetamos, retro orbitalmente, 1µg dos exossomos marcados fluorescentemente com NIR (do inglês *near infrared* - CellVue® Burgundy Fluorescent Cell Labeling Kit) em camundongos Balb/c sedentários, e, 24 h após a injeção, foi quantificado a biodistribuição dos exossomos em diferentes órgãos (pulmão, fígado, linfonodo, baço, tibia/fêmur, cérebro, rim, quadríceps, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, coração, adrenal, timo) (**Figura 15 e S1-S11**).

Tissue Explant Exosomes
Sedentary mice and Exercise

Retro Orbital Exosomes Injection
Into Naive Mouse
1ug per mouse
CellVue Labelling

24H

Exosome Biodistribution

Li-Cor Odyssey
Clx Infrared Scanner

Exercise

Sedentary

PBS

Figura 46: Desenho experimental para o ensaio de biodistribuição dos exossomos derivados de explantes teciduais murinos.

Nós observamos um alto consumo dos exossomos derivados de todos os explantes teciduais no pulmão, fígado e baço, sendo que os exossomos derivados do timo, baço e linfonodo foram os que apresentaram maiores consumo nesses tecidos (**Figuras 16A-16C**). Mais importante, o treinamento físico aumentou o consumo dos exossomos derivados do timo no pulmão, no fígado, no baço e no rim (**Figuras 16A, 16B, 16C, 16E**), além de aumentar o consumo dos exossomos derivados do fígado e baço no fígado e no baço (**Figuras 16B-16C**), sugerindo que os exossomos derivados do timo, fígado e baço são fatores que poderiam influenciar as adaptações ao treinamento físico nesses tecidos. Contrariamente, o treinamento físico reduziu o consumo dos exossomos derivados do músculo esquelético no pulmão, baço, fígado e quadríceps (**Figuras 16A, 16B, 16C, 16J**). Além disso, os exossomos do músculo esquelético foram pouco consumidos pelos outros tecidos, sugerindo que, em termos de exossomos, os exossomos derivados do músculo esquelético não são os maiores contribuintes para as adaptações do organismo induzido pelo treinamento físico.

A

E

B

F

C

G

D

H

Figura 47: *Treinamento físico afeta o organotropismo dos exossomos derivados de explantes teciduais.* Consumo dos exossomos no pulmão (A), fígado (B), baço (C), osso (D), rim (E), linfonodo (F), cérebro (G), coração (H), tecido adiposo branco (WAT) (I), Quadríceps (J), e tecido adiposo marrom (BAT) (K). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Por fim, em um estudo piloto, nós testamos se os exossomos derivados do sangue de humanos recapitulariam os resultados de biodistribuição dos exossomos derivados dos diferentes explantes teciduais murinos. Novamente, nós injetamos, retro orbitalmente, $1\mu\text{g}$ dos exossomos marcados fluorescentemente com NIR (do inglês *near infrared* - CellVue® Burgundy Fluorescent Cell Labeling Kit) em camundongos severamente imunodeficientes NOD.CB17-Prkdc SCID/J sedentários, e, 24 h após a injeção, foi quantificado a biodistribuição dos exossomos em diferentes órgãos (pulmão, fígado, cérebro, baço, tíbia/fêmur, adrenal, coração). Nós analisamos os exossomos derivados do sangue que foram coletados de um indivíduo treinado em repouso e imediatamente após sessão aguda de exercício (60 minutos de corrida). Similar aos resultados encontrados nos exossomos derivados dos diferentes explantes

teciduais murinos, os exossomos derivados do sangue humano foram consumidos majoritariamente pelo pulmão, fígado e baço (**Figuras 17A-17C, 17J**). No geral, todos esses resultados sugerem que o treinamento físico é capaz de afetar o consumo do exossomos de diferentes explantes teciduais murinos, e que os exossomos derivados do sangue humano parece recapitular o organotropismo dos exossomos murinos.

Figura 48: Exossomos derivados do sangue humano é majoritariamente consumido pelo pulmão, fígado e baço. Consumo dos exossomos no pulmão (A), fígado (B), baço (C), osso (D), timo (E), adrenal (F), rim (G), coração (H), cérebro (I). J: Imagem dos órgãos inteiros dos exossomos derivados do sangue humano marcados com NIR dye usando o sistema de imagem Odyssey (LI-COR Biosciences). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3 CONCLUSÃO

Até onde temos conhecimento, esse foi o primeiro estudo a verificar se o exercício afetaria a liberação, proteoma e organotropismo de exossomos de 12 diferentes explantes teciduais e do sangue. Demonstramos que os exossomos de todos os explantes teciduais e do sangue expressam proteínas comuns, as quais podem auxiliar nos protocolos de isolamento de exossomos de explantes teciduais. Além disso, esse foi o primeiro estudo a caracterizar as proteínas exossomais exclusivas de cada tecido, o que pode auxiliar a determinar a origem dos exossomos. Nós demonstramos que o exercício alterou a liberação, proteoma e organotropismo dos exossomos dos diferentes explantes teciduais, resultados esses que ajudarão à melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas adaptações do organismo induzidas pelo exercício físico, mais especificamente pelos exossomos liberados por diferentes tecidos.

Assim, concluímos que os resultados aqui encontrados poderão dar início à novas linhas de pesquisa que irão auxiliar na compreensão das alterações fisiológicas do organismo e da comunicação tecidual induzidas pelos exossomos frente ao estímulo do exercício físico. Isso ampliará o conhecimento das bases celulares e moleculares da fisiologia e bioquímica do exercício, dando suporte científico para a recomendação da prática regular de exercícios físicos para a saúde. Por além disso, novos mecanismos, quando desvendados, podem auxiliar no desenvolvimento de intervenções farmacológicas, com o intuito de mimetizar e/ou maximizar alguns dos efeitos benéficos do treinamento físico, principalmente em doenças crônicas degenerativas onde a prática de treinamento físico é proscrita ou ainda não pode ser recomendada.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos com camundongos foram realizados de acordo com as diretrizes do *Institutional Animal Care and Use Committees* (IACUC) e *American Association for Laboratory Animal Science* (AALAS) (Protocolo animal: Weill Cornell Medicine 0709-666A). A amostra desse projeto foi composta por camundongos fêmeas da linhagem BALB/C e camundongos fêmeas imunodeficientes NOD/SCID/ γ^c ^{-/-} (NSG) com idade de 8 semanas. Os

camundongos foram monitorados para estresse, doenças, ou crescimento tecidual anormal, e sacrificados caso fosse observado deterioração da saúde. Os camundongos foram providos com água e ração *ad libitum* e mantidos em biotério livre de patógenos. O sangue dos camundongos (0,25-1ml) foi coletado do sinus retro orbital por um tubo capilar (Fisher Scientific) e colocados em um tubo contendo EDTA (Fisher Scientific). Os camundongos foram sacrificados imediatamente após a última sessão de treino em câmara de CO₂. O explantes teciduais e o plasma dos camundongos foi agrupado dentro do mesmo grupo para o isolamento dos exossomos. Para os explantes teciduais, os tecidos foram cortados em pequenos pedaços (por volta de 1mm³) e cultivados por 16-18 horas em meio de cultura RPMI livre de soro e suplementado com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml).

4.2 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O treinamento físico aeróbio foi realizado segundo o protocolo desenvolvido por Ferreira *et al.* (2007) em sistema de esteira (FERREIRA et al., 2007). O treinamento físico teve duração de 4 semanas. Todos os camundongos realizaram 5 sessões semanais com aumento progressivo do tempo, chegando a 60 minutos, e aumento progressivo de sobrecarga de trabalho, chegando a 60% da velocidade máxima conseguida na avaliação da tolerância ao esforço físico máximo que corresponde a intensidade de máxima fase estável de lactato. Esse trabalho é caracterizado como de moderada intensidade com predomínio de metabolismo aeróbio.

4.3 Purificação, caracterização e análise dos exossomos derivados explantes teciduais

Os exossomos derivados dos explantes teciduais foram purificadas por ultracentrifugações sequenciais. A contaminação celular foi removida do sobrenadante dos explantes teciduais por centrifugação em 500xg por 10 minutos. Para remover corpos

apoptóticos e grandes debris celulares, o sobrenadante foi centrifugado em 3000xg por 20 minutos, seguido por centrifugação em 12000xg por 20 minutos para remover grandes microvesículas. Os exossomos foram coletados por ultracentrifugação em tubos de ultracentrifugação de 4 ou 31 mL (#355645 and #355631, Beckman Coulter) em 100.000xg for 70 minutos. Os exossomos foram lavados em PBS e ultracentrifugados novamente em 100.000xg em rotores ângulo-fixados de 50.4T1 ou 70Ti na ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XE or XPE. O pellet final de exossomos foi ressuspensionado em PBS, e a concentração proteica foi mensurada por BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific). O número e o tamanho dos exossomos foi analisado usando o sistema de caracterização de nanopartículas NS500 (NanoSight, Malvern Instruments) equipado com laser violeta (405nm).

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a marcação negativa da análise de microscopia eletrônica de transmissão, 0.1 mg/ml de exossomos em PBS foram colocados em uma grade revestida com formvar /carbono e deixados em repouso por 1 minuto. As amostras foram manchadas e coradas negativamente com 4 gotas sucessivas de 1,5% de acetato de uranila (aqu), manchando as amostras entre cada gota. Após a última gota da marcação, a grade foi enxugada e seca ao ar. As grades foram fotografadas com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JSM 1400 (JEOL, USA, Ltd, Peabody, MA) operando a 100Kv. As imagens foram capturadas em uma câmera Veleta 2K x 2K CCD (Olympus-SIS, Munich, Germany).

4.5 Análise dependente de dados de amostras de exossomos

As amostras de exossomos (tipicamente 5µg – ajuste baseado sobre a análise de BCA) foram secadas por centrifugação a vácuo e redissolvidas em 30-50µL 8M Uréia/50mM bicarbonato de amônio/10mM DTT. Após a lise e redução, as proteínas foram alquiladas com 20 ou 30mM iodoacetamida (Sigma). As proteínas foram digeridas com Endopeptidase Lys C (Wako) em < 4M de uréia seguido de tripsinização (Promega) em < 2M Uréia. Os peptídeos foram dessalinizados e concentrados por extração de fase sólida baseada em Empore C18 antes

da análise por alta resolução/alta precisão de massa de fase reversa (C18) nano-LC-MS/MS. Tipicamente, 30% das amostras foram injetadas. Os peptídeos foram separados em uma coluna (12cm/75mm, 3mm beads, Nikkyo Technologies) em 200 ou 300 nl/min com um gradiente aumentando de 1% Buffer B/95% buffer A até 40% buffer B/60% Buffer A por tipicamente 90 ou 120 min (buffer A: 0.1% formic acid, buffer B: 0.1% formic acid in 80% acetonitrile). Espectômetros de massa (Q-Exactive, Q-Exactive Plus, Q-Exactive-HF or Fusion Lumos, Thermo Scientific) foram operados em modo de íon positivo dependente de dados (DDA).

4.6 Análise de proteômica

Os dados de nano-LC-MS/MS de alta resolução/alta precisão foram processados usando Proteome Discoverer 1.4.1.14 (Thermo-Scientific, 2012)/Mascot 2.5 (Perkins et al., 1999). Os dados gerados foram analisados com UniProt's Complete MOUSE proteome usando os seguintes parâmetros: Enzima: Trypsin/P, máximo permitido de locais de clivagem perdidos: 2, tolerância de massa de precursor monoisotópico: 10 ppm, tolerância de massa de fragmento monoisotópico: 0.02 Da, modificações dinâmicas: Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term), modificação estática: Carbamidomethyl (C). Um filtro foi usado para calcular peptide *False Discovery Rates* (FDR) dos peptídeos, os quais foram calculados por arquivo. Um *false discovery rate* (FDR) de 1% foi aplicado para cada arquivo separado do LC-MS/MS.

4.7 Análises computacionais

Os dados de Tandem MS foram analisados com o software Proteome Discoverer v1.4/MASCOT. A abundância relativa de uma determinada proteína foi calculada a partir da área média dos três sinais de peptídeo mais intensos. Para esse software, essa medida de abundância varia aproximadamente 4 ordens de magnitude, resultando em uma faixa de sinal inferior a $0,8-1,2 \times 10^6$, que pode ser integrada para as proteínas de baixa abundância. As proteínas que apresentaram intensidades de área abaixo da faixa mínima ou não foram detectadas, foram atribuídas com uma área zero. Para as proteínas que foram identificadas por

vários UniProt ID, os valores da sonda (com base nos UniProt ID) foram recolhidos ao nível da proteína usando a sonda com a intensidade máxima.

Para a análise de frequência de proteínas exossomais baseada na presença ou ausência de proteínas, a abundância das proteínas não foi considerada; as proteínas foram classificadas como detectadas ou não detectadas nas diferentes amostras. The same criteria were applied for identifying exclusive markers across plasma samples. A geração dos heatmaps e a comparação entre as proteínas exossomais dos camundongos sedentários e treinados foram conduzidas pelo Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). As proteínas diferencialmente expressas entre os camundongos sedentários e treinados foram classificadas pela estatística de teste *t* de Student utilizando 1000 permutações. Essa lista foi posteriormente filtrada para aquelas proteínas detectadas em o menos 50% das amostras para um mesmo grupo. Para análise de Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (SUBRAMANIAN; TAMAYO; MOOTHA, 2014), nós usamos todo o conjunto de dados gerado na proteômica. Gene sets de Molecular signatures database (MSigDB, <https://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) v5.1 foram usados para o GSEA (C5: 825 gene sets baseado no termo Gene Ontology [GO]). Os parâmetros padrão foram usados para identificar gene sets significativamente enriquecidos.

4.8 Biodistribuição dos exossomos derivados de explantes teciduais

Os exossomos foram primeiramente marcado com *near-infrared dye* CellVue NIR815 (eBioscience) seguindo as especificações do fabricante, seguindo por lavagem com PBS e peletando os exossomos por ultracentrifugação em 100.000g por 70 minutos em 10 °C. Os exossomos marcados (1µg) foram ressuspensos em 100 µl de PBS, ou um volume equivalente de uma mistura com a reação mock, foram retro orbitalmente injetados nos camundongos. 24 horas após a injeção, os tecidos foram coletados e analisando o sistema de imagem Odyssey (LI-COR Biosciences).

4.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média. Foi aplicado teste *t-Student* bicaudal para amostras não-pareadas. O nível de significância adotado neste estudo foi de $p < 0,05$.

5 FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES

Figura S1: Biodistribuição dos exossomos derivados do timo.

Figura S2: Biodistribuição dos exossomos derivados baço.

Figura S3: Biodistribuição dos exossomos derivados linfonodo.

Figura S4: Biodistribuição dos exossomos derivados do osso.

Figura S5: Biodistribuição dos exossomos derivados do cérebro.

Figura S6: Biodistribuição dos exossomos derivados do rim.

Figura S7: Biodistribuição dos exossomos derivados fígado.

Figura S8: Biodistribuição dos exossomos derivados do pulmão.

Figura S9: Biodistribuição dos exossomos derivados músculo esquelético.

Figura S10: Biodistribuição dos exossomos derivados do tecido adiposo branco.

Figura S11: Biodistribuição dos exossomos derivados do tecido adiposo marrom.

Tabela S1: Proteínas exossomais exclusivas do sangue.

Accession	Description	GN	Sed Blood (LOG ₁₀ expression)	Exer Blood (LOG ₁₀ expression)
O08538	Angiopoietin-1	Angpt1	7.276461804	0
E9QAD6	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial (Fragment)	Atp5j	7.39497672	0
A0A0U1RNN8	CCR4-NOT transcription complex subunit 3 (Fragment)	Cnot3	7.206286044	0
A0A0R4J0E1	Fibrinogen-like protein 1	Fgl1	7.029789471	0
E9Q2E4	Protein Gm15800	Gm15800	7.141449773	0
Q8CFX1	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	H6pd	6.983445857	0
A0A075B5Y3	Protein Ighv1-80 (Fragment)	Ighv1-80	6.859798547	0
F6YQT7	Protein Lipi	Lipi	7.62838893	0
E9Q8F4	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Nnt	7.109915863	0
V9GXF6	Zinc finger protein 280D (Fragment)	Zfp280d	7.106870544	0
O89020	Afamin	Afm	7.949390007	7.86516322
Q8R0Z6	Angiopoietin-related protein 6	Angptl6	7.971275849	8.458788882
D3YXE8	Apolipoprotein C-II (Fragment)	Apoc2	8.38327665	8.215901813
Q61268	Apolipoprotein C-IV	Apoc4	8.042969073	8.298853076
A0A0U1RNV1	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5 (Fragment)	C1qtnf5	7.714245911	8.108226656
A2A998	Complement component C8 alpha chain	C8a	7.051923916	7.199206479
P11680	Properdin	Cfp	7.745543202	7.790144365
O88200	C-type lectin domain family 11 member A	Clec11a	7.236537261	7.411788005
Q8CF98	Collectin-10	Colec10	7.8409212	8.278296208
A0A0R4J0M6	Collectin-11	Colec11	8.421274791	8.754883228
P14847	C-reactive protein	Crp	7.623869268	8.068927612
B2RRC9	Coagulation factor VIII	F8	7.315130317	8.457730548
P01642	Ig kappa chain V-V region L7 (Fragment)	Gm10881	8.960946196	8.908377772
P06327	Ig heavy chain V region VH558 A1/A4	Gm5629	7.890197386	8.333447274
P01741	Ig heavy chain V region	HVM00	8.681874122	8.815378485
P01867	Ig gamma-2B chain C region	Igh-3	7.409933123	8.431041945
P01863	Ig gamma-2A chain C region, A allele	Ighg	8.011570444	8.861534411
A0A075B5U0	Protein Ighv1-12	Ighv1-12	8.298197867	8.40277707
A0A0A6YXA5	MCG114298 (Fragment)	Ighv1-15	8.911370707	8.858416878
A0A0A6YXN4	Protein Ighv1-18 (Fragment)	Ighv1-18	8.843793198	8.966986025
A0A075B5T1	Protein Ighv12-3 (Fragment)	Ighv12-3	8.728434951	9.173477643
A0A087WPN7	Protein Ighv13-2	Ighv13-2	7.71130096	7.870345371
A0A075B5V4	Protein Ighv1-37	Ighv1-37	8.25358029	8.372912003

A0A075B5T4	Protein Ighv1-4 (Fragment)	Ighv1-4	8.567849451	8.729569726
A0A075B5V8	Protein Ighv1-47	Ighv1-47	7.920957706	7.883888458
A0A075B5T5	Protein Ighv1-5	Ighv1-5	8.435047641	8.429913698
A0A075B5W5	Protein Ighv1-54 (Fragment)	Ighv1-54	7.952744024	8.353723938
A0A075B5X2	Protein Ighv1-63 (Fragment)	Ighv1-63	7.986726959	8.060320029
A0A075B5X6	Protein Ighv1-67	Ighv1-67	8.300812794	8.437116093
A0A0B4J1M0	Protein Ighv1-77	Ighv1-77	7.977403481	8.446070936
A0A075B5Y4	Protein Ighv1-81 (Fragment)	Ighv1-81	9.19893187	8.988558957
A0A0B4J1J7	Protein Ighv1-82	Ighv1-82	8.07773118	8.197004728
A0A075B5P8	Protein Ighv2-2 (Fragment)	Ighv2-2	8.191171456	8.624797579
P18531	Ig heavy chain V region 3-6	Ighv3-6	8.278067331	8.619510721
A0A075B5X4	Protein Ighv8-11 (Fragment)	Ighv8-11	8.530071569	8.740046724
A0A0G2JDE1	MCG116913 (Fragment)	Ighv8-12	8.459543258	9.049605613
A0A0A6Y Y60	Protein Ighv8-5 (Fragment)	Ighv8-5	8.360214613	8.745387121
A0A0A6Y XQ0	Protein Ighv8-8 (Fragment)	Ighv8-8	8.208172527	8.485579477
A0A075B5S1	Protein Ighv9-1	Ighv9-1	8.647676313	8.997735777
P01758	Ig heavy chain V region 108A	Igh-VJ558	7.431524584	8.037426498
A0A075B5L1	Protein Igkv10-94 (Fragment)	Igkv10-94	8.301029996	8.784617293
A0A075B666	Protein Igkv12-47 (Fragment)	Igkv12-47	8.232742063	8.56549363
A0A075B5L4	Protein Igkv12-89	Igkv12-89	8.020775488	8.448242413
A0A075B5K7	Protein Igkv14-100	Igkv14-100	8.241048151	8.935910136
A0A075B5K5	Protein Igkv2-112	Igkv2-112	7.571126277	7.875234946
A0A075B5P1	Protein Igkv3-1 (Fragment)	Igkv3-1	7.770189023	7.814180981
A0A0B4J1J0	Protein Igkv4-50 (Fragment)	Igkv4-50	8.147985321	8.497758718
J3QNZ9	Protein Igkv4-62	Igkv4-62	8.533772058	8.959709024
A0N8I8	Protein Igkv4-73 (Fragment)	Igkv4-73	7.72664572	7.722304787
A0A075B5L7	Protein Igkv4-80 (Fragment)	Igkv4-80	8.504198919	8.938119269
A0A075B5L6	Protein Igkv4-81	Igkv4-81	8.223755454	8.407390904
A0A075B5L3	Protein Igkv4-90 (Fragment)	Igkv4-90	8.019946682	8.003029471
A0A0G2JGT0	Protein Igkv8-23-1 (Fragment)	Igkv8-23-1	8.475235223	8.515078675
A0A075B5N5	Protein Igkv8-26 (Fragment)	Igkv8-26	7.32756326	7.830267801
A0A075B5K2	Protein Igkv9-124	Igkv9-124	8.708590845	8.81130684
A0A0B4J1K5	Protein Iglv3 (Fragment)	Iglv3	8.736635498	8.96964884

G3X8Q6	Kinesin-like protein	Kifc2	7.626443025	7.847017098
P01662	Ig kappa chain V-III region ABPC 22/PC 9245	KV3AA	8.184123354	8.452859336
P01652	Ig kappa chain V-V region J606	KV5AK	8.454692449	8.555215405
Q61805	Lipopolysaccharide-binding protein	Lbp	7.340642378	7.783975003
P01725	Ig lambda-1 chain V region S178	LV1C	8.34321159	8.452706227
O09111	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	Ndufb11	6.976258249	7.04060234
Q8R4V5	Oncoprotein-induced transcript 3 protein	Oit3	8.360214613	8.595275712
Q60590	Alpha-1-acid glycoprotein 1	Orm1	7.624797579	7.80611211
O70570	Polymeric immunoglobulin receptor	Pigr	7.139249218	7.773859552
Q60963	Platelet-activating factor acetylhydrolase	Pla2g7	7.344981414	7.296006669
Q60841	Reelin	Reln	8.148294097	8.596487134
E9QPB2	Suprabasin	Sbsn	6.823800154	7.13225969
Q06770	Corticosteroid-binding globulin	Serpina6	7.752893155	7.833911715
A2AVA0	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1	Svep1	7.455301772	7.90960951
H3BL73	Protein 1110032A03Rik (Fragment)	1110032A03Rik	0	7.881840968
Q9Z1R3	Apolipoprotein M	Apom	0	7.462098381
Q9ES30	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	C1qtnf3	0	7.620031895
Q8BH35	Complement component C8 beta chain	C8b	0	7.231724383
Q9DAC2	Complement component 8, gamma subunit, isoform CRA_b	C8g	0	7.149527014
Q3V1H1	Cytoskeleton-associated protein 2	Ckap2	0	6.8896378
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	Col1a1	0	7.65079304
P97872	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	Fmo5	0	7.21005085
F6R7E8	Protein Gm2663	Gm2663	0	7.669037801
Q61647	Hyaluronan synthase 1	Has1	0	7.144885418
P01745	Ig heavy chain V region MPC 11	HVM01	0	7.598024072
A0A0R4J0S2	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	Igfals	0	7.075911761
A0A075B5W6	Protein Ighv1-55 (Fragment)	Ighv1-55	0	8.683677299
A0A075B5U3	Protein Ighv1-62-1 (Fragment)	Ighv1-62-1	0	8.273695588
A0A075B5X5	Protein Ighv1-66 (Fragment)	Ighv1-66	0	7.462248215
A0A0B4J1N0	Protein Ighv1-76	Ighv1-76	0	7.988870966
A0A075B5Q5	Protein Ighv2-9 (Fragment)	Ighv2-9	0	8.158663981
A0A075B693	Protein Ighv8-4	Ighv8-4	0	6.959756673
A0A0G2JDI1	Protein Igkj5 (Fragment)	Igkj5	0	7.41313205
A0A0B4J1H9	Protein Igkv1-132 (Fragment)	Igkv1-132	0	7.958563883
A0A075B5M8	Protein Igkv12-38	Igkv12-38	0	7.500785173
A0A075B5K9	Protein Igkv12-98	Igkv12-98	0	8.169968174

A0A0G2J DU0	Protein Igkv8-34 (Fragment)	Igkv8-34	0	7.283979284
A0A0G2J DZ1	Protein Iglj2 (Fragment)	Iglj2	0	7.356981401
P01629	Ig kappa chain V-II region 2S1.3	KV2A4	0	7.855397997
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	Lrg1	0	7.278753601
F7B8J4	Probable carboxypeptidase PM20D1 (Fragment)	Pm20d1	0	7.135132651
Q8BND5	Sulfhydryl oxidase 1	Qsox1	0	7.209783015
Q00724	Retinol-binding protein 4	Rbp4	0	8.385248682
Q5SX48	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Fragment)	Slc25a11	0	6.796227314
B2RQA5	Sclerostin	Sost	0	7.926290987
Q8RII1	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	Uqcr10	0	7.241795431
Q9CPX8	Cytochrome b-c1 complex subunit 10	Uqcr11	0	6.927780849
Q9CQB4	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	Uqcrb	0	7.102776615

Tabela S2: Proteínas exossomais exclusivas do timo.

Accession	Description	GN	Sed Thymus (LOG ₁₀ Expression)	Exer Thymus (LOG ₁₀ expression)
D3YWB9	Contactin-associated protein-like 4	Cntnap4	6.941610802	0
A2APF3	Transcriptional repressor CTCFL	Ctcf1	6.858356705	0
Q9CZU4	GTPase Era, mitochondrial	Eral1	7.931050847	0
J3QMN6	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming]	Fmo6	7.816705184	0
P09602	Non-histone chromosomal protein HMG-17	Hmgn2	7.248463718	0
A0A0A0 MQC1	Immunoglobulin heavy variable 3-5	Ighv3-5	7.669874502	0
P54729	NEDD8 ultimate buster 1	Nub1	6.897517129	0
W4VSP9	E3 ubiquitin-protein ligase RAD18	Rad18	6.94472936	0
Q80VP0	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1	Tecpr1	6.266231697	0
A0A087 WPS8	Dual-specificity protein kinase TTK (Fragment)	Ttk	7.501333179	0
A0A1L1S SF8	RIKEN cDNA 4931406C07 gene	4931406C 07Rik	7.278296208	7.468642668
A0A0G2J DM4	Phosphatidylcholine translocator ABCB4 (Fragment)	Abcb4	8.033825694	7.730620798
A0A0R4J 120	Coiled-coil domain-containing protein 60	Ccdc60	7.102433706	7.500922239
A0A494B 9B3	Divergent protein kinase domain 1C (Fragment)	Dipk1c	8.199480915	8.545307116
A0A1W2 P7B6	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3A, mitochondrial (Fragment)	Gatd3a	7.164947373	7.753889331
A0A140T 8M2	Immunoglobulin kappa variable 12-44 (Fragment)	Igkv12-44	7.383815366	7.602494069
A0A140T 8P6	Immunoglobulin kappa variable 12-46 (Fragment)	Igkv12-46	7.331427297	7.382017043
A0A140T 8P5	Immunoglobulin kappa chain variable 8-24 (Fragment)	Igkv8-24	7.324899497	7.632254777
P50294	Arylamine N-acetyltransferase 1	Nat1	7.115943177	7.195346058
Q8BG41	Proteasome subunit beta type-11	Psmb11	7.5834255	7.825036441
A0A2I3B PG9	Ribosomal protein L36A, pseudogene 1	Rpl36a- ps1	7.33405144	7.583538819
A0A494B AN1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2A (Fragment)	Ube2d2a	7.357934847	7.366796383

A0A338P6T5	Vacuolar protein sorting-associated protein 26C	Vps26c	7.084933575	7.295127085
Q5SPH3	Protein 4930438A08Rik	4930438A08Rik	0	7.501196242
A0A0J9YU24	Acylglycerol kinase, mitochondrial	Agk	0	7.286231854
Q9Z277	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	Baz1b	0	7.15896526
A2APX3	Cystatin-C (Fragment)	Cst3	0	7.356217134
G3X922	MCG115602	Dnajc13	0	6.970718704
Q99LT0	Protein dpy-30 homolog	Dpy30	0	6.892261607
A0A338P7B7	Dynein light chain Tctex-type 1A	Dynlt1a	0	7.149219113
Q8BTJ4	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase enpp4	Enpp4	0	6.95007263
A0A087WSA6	Protein Gm7356	Gm7356	0	7.34084055
A0A0U1RQ18	Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment)	Gpi1	0	6.99895644
Q8VEB1	G protein-coupled receptor kinase 5	Grk5	0	7.204933522
Q64282	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Ifit1	0	7.611723308
A0A075B5S3	Protein Ighv14-4	Ighv14-4	0	7.464191371
P04940	Ig kappa chain V-VI region NQ2-17.4.1	KV6A6	0	7.584783379
A0A2I3BQ16	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1	Lrch1	0	6.711385379
P35459	Lymphocyte antigen 6D	Ly6d	0	7.586137025
A2AW86	Lymphocyte antigen 75	Ly75	0	7.265525335
H3BJI7	Protein Methig1	Methig1	0	7.442793226
P43247	DNA mismatch repair protein Msh2	Msh2	0	6.958898195
A0A2I3BRS5	Ubiquitin thioesterase otulin (Fragment)	Otulin	0	7.041787319
Q8BWM0	Prostaglandin E synthase 2	Ptges2	0	7.081347308
Q8CFV9	Riboflavin kinase	Rfk	0	7.16613397
Q60611	DNA-binding protein SATB1	Satb1	0	6.913919765
Q9JK48	Endophilin-B1	Sh3glb1	0	6.820201459
Q99JR8	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2	Smardc2	0	7.315970345
E9Q2X6	Structural maintenance of chromosomes protein	Smc4	0	7.037824751
Q9QXJ2	Signal transducer and activator of transcription	Stat2	0	6.896966902
Q8BGW0	Protein THEMIS	Themis	0	7.086715664

Tabela S3: Proteínas exossomais exclusivas do linfonodo.

Accession	Description	GN	Sed LN (LOG ₁₀ expression)	Exer LN (LOG ₁₀ expression)
B7ZCU2	Abl interactor 1	Abi1	7.108903128	0
Q9DC42	Adhesion G protein-coupled receptor E5	Adgre5	6.981365509	0
Q924K1	Aryl-hydrocarbon-interacting protein-like 1	Aipl1	8.104145551	0
F6W3A0	Ecto-ADP-ribosyltransferase 3 (Fragment)	Art3	7.061075324	0
P84444	C-C motif chemokine 21a	Ccl21a	7.009875634	0
Q2VLH6	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	Cd163	6.709778602	0
Q8CJ91	CD209 antigen-like protein B	Cd209b	6.909769915	0
Q91ZW8	CD209 antigen-like protein D	Cd209d	7.013258665	0
P24161	T-cell surface glycoprotein CD3 zeta chain	Cd247	7.462697408	0
E9Q9E8	SLAM family member 5	Cd84	7.035429738	0
A0A087WS26	Dedicator of cytokinesis protein 10 (Fragment)	Dock10	6.793441133	0
D6RGU3	Dedicator of cytokinesis protein 2	Dock2	6.965060521	0

F6W2Q5	Epidermal growth factor receptor substrate 15	Eps15	6.678700435	0
Q8VD58	Protein EVI2B	Evi2b	7.271144318	0
A0A0B4J1G1	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II	Fcgr2b	6.935104021	0
Q99MI6	GTPase IMAP family member 3	Gimap3	6.930235653	0
O89100	GRB2-related adaptor protein 2	Grap2	6.757396029	0
B1AT92	Growth factor receptor-bound protein 2	Grb2	6.57989787	0
Q3U2S8	Voltage-gated hydrogen channel 1	Hvcn1	7.394276527	0
E9PX64	Kinesin-like protein	Kif26b	8.348110068	0
A0A140LJF0	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	Map4k1	7.329397879	0
A0A0A6YY78	Serine/threonine-protein kinase MARK1 (Fragment)	Mark1	7.067814511	0
A2A7Y5	Migration and invasion-inhibitory protein	Miip	6.840545188	0
A1L314	Macrophage-expressed gene 1 protein	Mpeg1	6.931203525	0
Q99N09	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 6B	Ms4a6b	7.359835482	0
G3XA39	Nuclear respiratory factor 1	Nrf1	6.821054755	0
E0CY82	Programmed cell death protein 10 (Fragment)	Pdcd10	6.909342038	0
A0A0N4SU Y2	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase O	Ptpro	6.834420704	0
D3Z6Z7	RAS protein activator-like-3	Rasal3	7.084933575	0
F6WK59	Regulator of G-protein-signaling 19 (Fragment)	Rgs19	6.935708748	0
Q8BYP3	Rho-related GTP-binding protein RhoF	Rhof	6.850278553	0
Q9JKV5	Secretory carrier-associated membrane protein 4	Scamp4	7.030194785	0
Q3UUV5	Src kinase-associated phosphoprotein 1	Skap1	6.906173364	0
A2AD84	Serine/threonine-protein kinase 26	Stk26	6.931712067	0
O88983	Syntaxin-8	Stx8	7.084576278	0
D3YVV1	Cell cycle control protein	Tmem30a	7.076640444	0
Q6ZWY8	Thymosin beta-10	Tmsb10	7.582971929	0
A0A1L1SQ19	Tetraspanin (Fragment)	Tspan3	6.913972712	0
P43404	Tyrosine-protein kinase ZAP-70	Zap70	6.979502849	0
E9Q4R3	Rho GTPase-activating protein 4	Arhgap4	6.672374979	6.666892211
Q62192	CD180 antigen	Cd180	7.285782274	6.868291688
P08920	T-cell surface antigen CD2	Cd2	7.551571974	7.401055726
P35329	B-cell receptor CD22	Cd22	7.272305844	7.184975191
P04235	T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain	Cd3d	7.765966425	7.39497672
P22646	T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain	Cd3e	7.851441815	7.858356705
P11942	T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain	Cd3g	7.457881897	7.557867962
P06332	T-cell surface glycoprotein CD4	Cd4	7.775537635	7.581608366
A2A5L7	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (Fragment)	Cd40	7.2509077	7.025715384
P18181	CD48 antigen	Cd48	7.971739591	7.638888425
Q61003	T-cell differentiation antigen CD6	Cd6	7.181843588	7.029383778
Q8VCN6	CD99 antigen	Cd99	7.704493697	7.474216264
A0A0G2JGI2	Histone H3-like centromeric protein A (Fragment)	Cenpa	7.112269768	6.92417587
Q91V08	C-type lectin domain family 2 member D	Clec2d	7.521922245	7.353723938
A0A140LJ27	Fc receptor, IgE, low affinity II, alpha polypeptide (Fragment)	Fcer2a	6.895974732	6.689486448
A0A0U1RPI1	Phospholemman	Fxyd1	7.052693942	7.184123354
O35601	FYN-binding protein 1	Fyb1	7.399154334	7.170848204
Q3UIZ5	G-protein-signaling modulator 3	Gpsm3	7.33264041	7.329601248
B1ASP2	Tyrosine-protein kinase	Jak1	7.252367514	7.085290578
A0A0U1RPO3	Linker for activation of T-cells family member 1	Lat	6.952162574	6.785044958

E9PV93	T-lymphocyte surface antigen Ly-9	Ly9	7.411788005	7.137986733
Q99N05	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4D	Ms4a4d	7.042181595	7.074816441
Q5SUA5	Unconventional myosin-Ig	Myo1g	7.246498581	7.137037455
Q8K124	Pleckstrin homology domain-containing family O member 2	Plekho2	6.976349979	6.994800899
A0A5F8MPY8	Rho family-interacting cell polarization regulator 2	Ripor2	6.979957893	7.246498581
Q9ET39	SLAM family member 6	Slamf6	7.108565024	7.07773118
O55098	Serine/threonine-protein kinase 10	Stk10	7.256477206	7.099335278
G3UZX6	Small ubiquitin-related modifier 3 (Fragment)	Sumo3	7.48258777	7.329194415
A0A075B662	T cell receptor alpha constant	Trac	7.738304793	7.612995656
A0A075B5J3	T cell receptor beta, constant region 1	Trbc1	7.63738965	7.467903947
Q8BH43	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	Wasf2	7.288919606	7.255995727
Q9R1W5	Calcitonin gene-related peptide type 1 receptor	Calcl	0	7.178401342
Q80V42	Carboxypeptidase M	Cpm	0	6.787460475
Q3U5N6	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C	Ms4a4c	0	7.07773118
D3YYR5	P2X purinoceptor 4	P2rx4	0	6.472902652
Q9R0N5	Synaptotagmin-5	Syt5	0	8.101747074

Tabela S4: Proteínas exossomais exclusivas do baço.

Accession	Description	GN	Sed Spleen (LOG ₁₀ expression)	Exer Spleen (LOG ₁₀ expression)
Q61549	Adhesion G protein-coupled receptor E1	Adgre1	7.550961752	0
Q3TSG4	RNA demethylase ALKBH5	Alkbh5	7.354108439	0
Q99LB4	Capping protein (Actin filament), gelsolin-like	Capg	7.846027675	0
P25918	B-lymphocyte antigen CD19	Cd19	7.611298362	0
Q62507	Cochlin	Coch	7.737192643	0
Q61462	Cytochrome b-245 light chain	Cyba	7.199206479	0
O88741	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	Gdap1	7.461648568	0
A0A087WRY5	Beta-galactosidase-1-like protein (Fragment)	Glb1l	8.301680949	0
P11032	Granzyme A	Gzma	7.563481085	0
A2AP78	High mobility group protein B3 (Fragment)	Hmgb3	7.556302501	0
P21812	Mast cell protease 4	Mcpt4	7.394101302	0
Q9CRB2	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	Nhp2	7.440909082	0
D3Z016	Proteasome assembly chaperone 4	Psmg4	6.968109201	0
Q9D6D0	Protein Slc25a27	Slc25a27	8.093071306	0
D3Z564	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2 (Fragment)	Tab2	8.535040813	0
F6RX08	Nucleoprotein TPR (Fragment)	Tpr	7.562173863	0
A0A0R4J0U8	RIKEN cDNA 1190005F20, isoform CRA_a	Trmt1l	6.963598963	0
Q8R5A3	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein	Apbb1ip	7.483301952	7.708250889
Q64285	Bile salt-activated lipase	Cel	7.568788212	8.46612587
P05208	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	Cela2a	7.840357059	8.310905629
P21844	Chymase	Cma1	8.140508043	7.536684673
Q7TPZ8	Carboxypeptidase A1	Cpa1	7.829368108	8.25791845
P15089	Mast cell carboxypeptidase A	Cpa3	8.256236533	7.543322901
B2RS76	Carboxypeptidase B1 (Tissue)	Cpb1	7.700703717	7.983851719
Q8R2E9	ERO1-like protein beta	Ero1b	7.226084116	7.632558515
Q921I9	Exosome complex component RRP41	Exosc4	7.579669294	6.98846977

Q8BTS3	Guanylate-binding protein 9	Gbp9	7.474216264	7.984707294
Q9ESM6	Glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase GDPD2	Gdpd2	7.848373884	7.708335903
Q9D733	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2	Gp2	8.090963077	8.503926804
Q31099	H2-M beta 2	H2-DMb2	7.496929648	7.419129308
P14901	Heme oxygenase 1	Hmox1	7.924847633	7.397244581
H3BKC8	Integrin alpha-D	Itgad	7.782185866	7.561816664
O89017	Legumain	Lgmn	7.52179165	7.681783766
E9PVX6	Protein Mki67	Mki67	7.399154334	6.556423121
O35242	Protein FAN	Nsmaf	6.725339816	7.226599905
Q8C5P5	5'-nucleotidase domain-containing protein 1	Nt5dc1	7.733919151	7.410608543
Q9D0B6	Protein PBDC1	Pbdc1	7.546789352	7.636888907
D3Z6P0	Protein disulfide-isomerase A2	Pdia2	7.543322901	7.783188691
F6XUT1	Protein PML (Fragment)	Pml	6.873494982	7.512684396
Q9JK88	Serpin I2	Serpini2	7.718750735	8.048053173
P29533	Vascular cell adhesion protein 1	Vcam1	7.516535374	7.639586087
G3XA09	Apoptotic protease-activating factor 1	Apaf1	0	7.483872454
Q08024	Core-binding factor subunit beta	Cbfb	0	7.349083169
Q91X79	Chymotrypsin-like elastase family member 1	Cela1	0	7.936714758
Q9WVJ3	Carboxypeptidase Q	Cpq	0	7.751048035
Q99388	Component of Sp100-rs	Csprs	0	7.500373714
P97314	Cysteine and glycine-rich protein 2	Csrp2	0	8.034227261
P43346	Deoxycytidine kinase	Dck	0	7.402433346
E9QPG8	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Dmbt1	0	7.382017043
D3Z512	Deoxyribonuclease-2-alpha	Dnase2a	0	7.734239604
Q9ET22	Dipeptidyl peptidase 2	Dpp7	0	7.448860846
G3UWP7	Decapping and exoribonuclease protein (Fragment)	Dxo	0	6.910997716
A0A0J9YUY0	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta (Fragment)	Eif2b4	0	7.665299499
A2AFQ9	Gem-associated protein 5	Gemin5	0	8.369401414
Q9Z0L8	Gamma-glutamyl hydrolase	Ggh	0	7.644930708
Q8R379	GTPase, IMAP family member 7	Gimap7	0	7.740836207
A0A0R3P9C7	GTPase IMAP family member 8	Gimap8	0	6.413467413
G3X987	GTPase, IMAP family member 9, isoform CRA_a	Gimap9	0	7.686278678
Q3U0A6	Protein Hbq1b	Hbq1b	0	7.742410881
Q9ESY9	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	Ifi30	0	7.892595423
P15261	Interferon gamma receptor 1	Ifngr1	0	8.28780173
O54782	Epididymis-specific alpha-mannosidase	Man2b2	0	7.587823171
Q91YR5	Methyltransferase-like protein 13	Mettl13	0	7.270911639
H3BL13	N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (Fragment)	Naaa	0	7.626648268
Q8VEJ4	Notchless protein homolog 1	Nle1	0	7.597585502
Q8R5F3	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase 1	Oard1	0	7.458939862
A0A0R4J0B2	Phospholipase B-like 1	Plbd1	0	7.524915148
Q6P8U6	Pancreatic triacylglycerol lipase	Pnlip	0	7.480868924
Q5BKQ4	Inactive pancreatic lipase-related protein 1	Pnliprp1	0	7.753889331
Q6P2K6	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	Ppp4r3a	0	7.451325808
P33610	DNA primase large subunit	Prim2	0	7.461648568

Q9D3U0	Putative tRNA pseudouridine synthase Pus10	Pus10	0	7.510946949
Q91VU7	Protein Pus7	Pus7	0	7.063333359
A2ABZ2	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (Fragment)	Pycr1	0	7.314499228
Q9JMA2	Queuine tRNA-ribosyltransferase	Qtrt1	0	7.488832634
E9PYG6	Protein Rasa1	Rasa1	0	7.049218023
Q8K4Z5	Splicing factor 3A subunit 1	Sf3a1	0	7.806383502
A0A0J9YV90	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1	Tbl1xr1	0	6.680879174
E9Q1D5	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	Tgfbli1	0	7.739967697
Q8K003	Translation machinery-associated protein 7	Tma7	0	7.56431091
Q9D8Y7	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2	Tnfaip8l2	0	7.521007252
Q5SU71	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	Trim25	0	7.211120541
Q80WB5	Protein N-terminal glutamine amidohydrolase	Wdyhv1	0	7.584783379
F8VPP8	Protein Zc3h7b	Zc3h7b	0	6.554610285

Tabela S5: Proteínas exossomais exclusivas do osso.

Accession	Description	GN	Sed Bone (LOG ₁₀ expression)	Exer Bone (LOG ₁₀ expression)
O35640	Annexin A8	Anxa8	7.586362223	0
F6T2X5	Protein BC034090	BC034090	7.970439863	0
A0A067XG53	Peripheral plasma membrane protein CASK (Fragment)	Cask	6.559188189	0
Q8R2S8	CD177 antigen	Cd177	7.807467376	0
Q8VE73	Cullin-7	Cul7	6.370142847	0
Q8BFW6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	Entpd3	7.813981076	0
A0A0B4J1F0	Integrin alpha-11	Itga11	7.631545228	0
Q9Z1F6	Leukocyte cell-derived chemotaxin 1	Lect1	8.015778756	0
Q9D0F3	Protein ERGIC-53	Lman1	8.004751156	0
P55302	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	Lrpap1	7.489395922	0
A0A0G2JGX1	Lactotransferrin (Fragment)	Ltf	7.649432223	0
A0A087WRP7	Lymphocyte antigen 6C1 (Fragment)	Ly6c1	8.11991541	0
Q5NCS9	Mitochondrial dynamics protein MID49	Mief2	7.077004327	0
P03930	ATP synthase protein 8	Mtatp8	7.912859475	0
Q9JJW5	Myozenin-2	Myoz2	7.687172105	0
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Ndufa12	7.420120848	0
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	Ndufa6	7.497482537	0
D3YXT0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Ndufs2	7.840795899	0
S4R2R9	Nucleobindin-2 (Fragment)	Nucb2	7.3586961	0

Q8BK62	Olfactomedin-like protein 3	Olfml3	8.064457989	0
Q60715	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4ha1	7.268343914	0
D6RDS8	Pannexin-3	Panx3	7.379668034	0
E0CXV1	Protein Rapgef1	Rapgef1	6.527501011	0
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	Slc25a12	7.419625361	0
P58242	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	Smpd13b	6.768490105	0
Q8BZ71	SH3 and cysteine-rich domain-containing protein 3	Stac3	7.730943693	0
E0CXD9	Surfeit locus protein 4	Surf4	7.231214648	0
E9Q7G1	Protein Tmed7	Tmed7	7.399327532	0
E0CY07	Protein kish	Tmem167	7.305351369	0
O08712	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	Tnfrsf11b	8.223495941	0
Q8C0E3	Tripartite motif-containing protein 47	Trim47	7.125806458	0
Q61282	Aggrecan core protein	Acan	9.681693392	9.10720997
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	Acp5	8.219060332	7.825036441
Q99MQ4	Asporin	Aspn	7.755951041	7.855337404
Q99N28	Cell adhesion molecule 3	Cadm3	7.774735883	7.826074803
Q8R422	CD109 antigen	Cd109	7.700011062	7.456669629
O55226	Chondroadherin	Chad	7.948510769	7.964023793
Q66K08	Cartilage intermediate layer protein 1	Cilp	7.533517862	7.689752696
Q8C4U8	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	Edil3	8.018284308	7.658679029
G3X9S2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1, isoform CRA_d	Enpp1	7.867349617	7.809290301
P08508	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III	Fcgr3	7.719497017	7.736794755
F8WHM5	Golgi apparatus protein 1 (Fragment)	Glg1	7.243286146	7.574609941
Q5PRF0	HEAT repeat-containing protein 5A	Heatr5a	6.945419343	7.137986733
P20060	Beta-hexosaminidase subunit beta	Hexb	7.441695136	7.478277832
P11688	Integrin alpha-5	Itga5	7.786183346	7.626134979
A0A0R4J1B4	Integrin alpha-M	Itgam	7.713322505	7.796713063
O35367	Keratocan	Kera	7.858717615	7.794906107
P48678	Prelamin-A/C	Lmna	7.760120785	7.642068627
Q8BHC0	Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1	Lyve1	7.635383204	7.635483747
Q64449	C-type mannose receptor 2	Mrc2	7.782902406	7.73102438
E9QJU4	Myozenin-3	Myoz3	7.507180977	7.315760491
Q9JI75	Ribosylidihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]	Nqo2	7.603360924	7.589391023
Q3V1T4	Prolyl 3-hydroxylase 1	P3h1	7.604657972	7.393224116
E9Q5V9	PCI domain-containing protein 2	Pcid2	7.225567713	6.807805532
P70669	Metalloendopeptidase homolog PEX	Phex	7.750122527	7.616790486
Q9R0B9	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	Plod2	8.047274867	7.818819508
P30412	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	Ppic	7.770778396	7.591398551
F6ZK01	Myeloblastin (Fragment)	Prtn3	7.906819715	7.845718018
Q91YQ5	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	Rpn1	7.230704314	7.343605508

P0C5K1	Serine/threonine-protein kinase SBK2	Sbk2	8.245512668	8.266466895
P19324	Serpin H1	Serpinh1	8.228656958	8.007747778
P82347	Delta-sarcoglycan	Sgcd	7.694868328	7.615844883
Q9JJY3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	Smpd3	7.689131197	7.213252052
Q8R5A0	N-lysine methyltransferase SMYD2	Smyd2	7.724521627	7.624591459
Q5NCU3	SPARC (Fragment)	Sparc	7.494988974	7.489114369
G3X973	Stabilin 1, isoform CRA_a	Stab1	7.203848464	7.145196406
A0A286YDS5	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 =Mus musculus OX=10090 GN=Tmed9 PE=1 SV=1 - [A0A286YDS5_MOUSE]	Tmed9	7.783117137	7.696006715
P99028	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	Uqcrh	7.643452676	7.792111409
E9PUA2	Terminal uridylyltransferase 7	Zcchc6	8.300812794	8.128722284
F7B209	Ankyrin repeat domain-containing protein 13A (Fragment)	Ankrd13a	0	7.195899652
Q8C172	Ceramide synthase 6	Cers6	0	7.868585667
Q8BMK4	Cytoskeleton-associated protein 4	Ckap4	0	7.137037455
Q9EPW4	C-type lectin domain family 3 member A	Clec3a	0	6.864511081
B2ZRS5	DEP domain-containing mTOR-interacting protein	Depto	0	6.615423953
Q8BXA1	Golgi integral membrane protein 4	Golgm4	0	7.053462605
Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Ndufs3	0	7.618048097
D6RFN5	Ninjurin-1	Ninj1	0	7.553154548
F6XSA1	Nucleolar protein 4 (Fragment)	Nol4	0	9.394101302
Q8R0G9	Nuclear pore complex protein Nup133	Nup133	0	7.020775488
Q8VG96	Olfactory receptor	Olfr109	0	8.691700208
E9PUN5	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2	Ror2	0	6.791480116
Q99MR3	Solute carrier family 12 member 9	Slc12a9	0	7.243781916
P46978	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	Stt3a	0	7.337858429
Q70IV5	Synemin	Synm	0	7.675503385
Q9EP64	Tenomodulin	Tnmd	0	7.674493717

Tabela S6: Proteínas exossomais exclusivas do fígado.

Accession	Description	GN	Sed Liver (LOG ₁₀ expression)	Exer Liver (LOG ₁₀ expression)
Q8CG72	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3	Adprhl2	7.600864036	0
Q9DBA8	Probable imidazolonepropionase	Amdhd1	7.740678425	0
P56382	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	Atp5e	8.014520539	0
A0A0J9YV17	Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog (Fragment)	Brca2	8.693902741	0
Q63880	Carboxylesterase 3A	Ces3a	7.211387553	0
P00375	Dihydrofolate reductase	Dhfr	7.761852694	0
Q80VJ3	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1	Dnph1	7.229169703	0
F6SGT4	Exosome complex component RRP43 (Fragment)	Exosc8	7.423409728	0

Q8R3R8	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	Gabarap11	7.029789471	0
A0A0R4J1H2	Glycerate kinase	Glyctk	8.83828225	0
Q3UED7	Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgga2 protein	Gm4951	7.002597981	0
Q91YP0	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	L2hgdh	7.756636108	0
Q8R3F5	Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial	Mcat	7.851625203	0
O08795	Glucosidase 2 subunit beta	Prkcsh	7.957224058	0
Q8R1Q9	Ribokinase	Rbks	7.615634469	0
Q8R000	Organic solute transporter subunit alpha	Slc51a	9.325310372	0
A0A0J9YUR9	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K (Fragment)	Ube2k	7.775901579	0
Q6P5G6	UBX domain-containing protein 7	Ubxn7	7.727459921	0
D3YZE6	UDP-glucuronosyltransferase (Fragment)	Ugt1a6a	7.342422681	0
D3Z4U1	Uricase	Uox	7.57054294	0
O70480	Vesicle-associated membrane protein 4	Vamp4	7.967032882	0
Q99K67	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial	Aass	8.2219356	8.478710756
J3QNY6	Bile salt export pump	Abcb11	7.984077034	7.724930914
Q8VCW8	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial	Acsf2	7.706632451	7.685562611
Q9QYY9	Alcohol dehydrogenase 4	Adh4	8.514282048	8.683947131
Q8K4H1	Kynurenine formamidase	Afmid	7.707825568	7.865636888
Q91X34	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	Baat	8.227372442	8.222196046
Q924Y0	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	Bbox1	8.803183889	8.902002891
P97864	Caspase-7	Casp7	7.30920418	7.774662923
Q9WU84	Copper chaperone for superoxide dismutase	Ccs	7.720324717	7.849050691
Q91X77	Cytochrome P450 2C50	Cyp2c50	7.865932668	8.09131516
E9Q0G1	Density-regulated protein (Fragment)	Denr	8.005609445	7.730943693
Q9DBT9	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	Dmgdh	8.341632336	8.279666944
Q8CHR6	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	Dpyd	7.732795698	7.917715517
Q8BL66	Early endosome antigen 1	Eea1	7.601081728	7.721480855
A7MCT6	Ethanolamine kinase 2	Etnk2	8.213783299	8.238046103
P12710	Fatty acid-binding protein, liver	Fabp1	8.783546282	8.5470359
P46656	Adrenodoxin, mitochondrial	Fdx1	8.485437481	8.628286731
A2AMS3	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	Galt	7.959566047	8.013679697
A0A0J9YUI8	Glucokinase regulatory protein	Gckr	7.389697548	7.645127399
Q78JT3	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	Haao	8.198657087	8.517591731
Q9WU19	Hydroxyacid oxidase 1	Hao1	8.1752218	8.467312063
Q9CYW4	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	Hdhd3	8.209783015	8.150449409
P49429	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Hpd	8.858055718	8.983581187
E9QLT0	Hydroxypyruvate isomerase	Hyi	7.513617074	7.821971818
Q9CXF0	Kynureninase	Kynu	8.32056168	8.203576775
Q9D7I5	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	Lhpp	7.738146089	7.774662923
A0A0N4SVK3	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM5	Lsm5	7.233757363	7.514149134
Q9DD20	Methyltransferase-like protein 7B	Mettl7b	7.694078462	6.514547753
Q14CH1	Molybdenum cofactor sulfurase	Mocos	7.283753383	7.504334912
P02798	Metallothionein-2	Mt2	8.080265627	8.61658053
O08601	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit	Mttp	7.730378469	7.794209116
Q8R1A8	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	Otc	8.690284703	8.461648568
P08003	Protein disulfide-isomerase A4	Pdia4	7.916822285	8.077004327
O35386	Phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal	Phyh	8.042575512	8.061829307

Q99KR7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	Ppif	8.018284308	7.760573254
Q64374	Regucalcin	Rgn	8.887954704	8.979457318
Q8VBT2	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	Sds	7.497344381	7.485011215
P52843	Bile salt sulfotransferase 1	Sult2a1	8.098297536	8.130976692
Q8BGL3	Sulfotransferase	Sult2a8	7.906335042	7.767526899
C5NSA7	Tryptophan 2,3-dioxygenase	Tdo2	7.511214701	7.842234686
Q4FZG7	Putative mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A-B	Timm8a2	7.731910942	7.77633791
Q8QZZ7	EKC/KEOPS complex subunit Tprkb	Tprkb	7.410439786	7.538950562
Q8VBW8	Tetratricopeptide repeat protein 36	Ttc36	7.812311609	8.190891717
A0A0R4J1Y7	Thioredoxin domain-containing protein 5	Txndc5	7.514680544	7.532754379
Q283N4	2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase	Urad	7.731910942	7.872564143
H3BKR0	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 (Fragment)	Atpaf1	0	7.514813295
O89110	Caspase-8	Casp8	0	7.812311609
Q91WM2	Cat eye syndrome critical region protein 5 homolog	Cecr5	0	8.319522449
Q3ULK8	Cellular nucleic acid binding protein, isoform CRA_a	Cnbp	0	7.962464046
E9PYH3	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	Etnppl	0	6.593839661
Q9QZM9	F-box only protein 16	Fbxo16	0	7.956072337
Q80Y14	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial	Glrx5	0	7.901839592
Q9QZ85	Interferon-inducible GTPase 1	Iigp1	0	7.442009159
Q3UPC7	Uncharacterized protein KIAA0825 homolog	K0825	0	7.716754357
B2RQA1	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 10	Kcna10	0	8.546295835
Q3U0V1	Far upstream element-binding protein 2	Khsrp	0	8.564192461
Q6ZWM4	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8	Lsm8	0	7.809492377
Q5RKZ7	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1	Mocs1	0	7.61658053
Q7TT41	DBH-like monooxygenase protein 2	Moxd2	0	7.005609445
Q8CG29	Myosin IF	Myo1f	0	7.92556991
B1AWZ5	Protein NipSnap homolog 3B	Nipsnap3b	0	7.72664572
Q9DCN1	Peroxisomal NADH pyrophosphatase NUDT12	Nudt12	0	7.604442066
Q99P30	Peroxisomal coenzyme A diphosphatase NUDT7	Nudt7	0	7.940466678
O70400	PDZ and LIM domain protein 1	Pdlim1	0	7.743196081
Q9QVY8	Retinoic acid-induced protein 2	Rai2	0	7.887842265
Q5SSA5	Ran-binding protein 17	Ranbp17	0	7.935759104
A2AA71	Protein transport protein Sec24A	Sec24a	0	7.84509804
Q9CX34	Protein SGT1 homolog	Sugt1	0	7.778946728
Q69ZT9	TBC1 domain family member 30	Tbc1d30	0	8.122870923
Q99PJ2	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIM8	Trim8	0	8.035829825
E9PY03	Protein Tstd1	Tstd1	0	7.635483747
D3Z271	Protein Wbscr27 (Fragment)	Wbscr27	0	7.488550717

Tabela S7: Proteínas exossomais exclusivas do pulmão.

Accession	Description	GN	Sed Lung (LOG ₁₀ expression)	Exer Lung (LOG ₁₀ expression)
Q9QUJ7	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	Acs14	6.599992178	0
Q9WTY4	Aquaporin-5	Aqp5	8.850278553	0
H3BJU7	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Arhgef2	7.744371227	0
O08997	Copper transport protein ATOX1	Atox1	7.661812686	0

B1AQ57	Copper-transporting ATPase 2	Atp7b	7.117271296	0
E9Q861	Protein C2cd4a	C2cd4a	7.771366971	0
Q06138	Calcium-binding protein 39	Cab39	7.581494542	0
Q9JLQ0	CD2-associated protein	Cd2ap	7.089198367	0
D3Z2Z5	Chitinase-3-like protein 1 (Fragment)	Chil1	7.201397124	0
Q9DB34	Charged multivesicular body protein 2a	Chmp2a	7.642958879	0
Q8QZT4	Protein crumbs homolog 3	Crb3	7.921218121	0
P58466	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1	Ctdsp1	7.917558021	0
D3Z7F1	Cytochrome P450 2S1	Cyp2s1	7.309843005	0
D3YVS7	Cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein 1 (Fragment)	Cystm1	7.643353962	0
A2AW79	Dedicator of cytokinesis protein 7 (Fragment)	Dock7	7.018284308	0
Q8BG67	Protein EFR3 homolog A	Efr3a	7.599883072	0
A0A0B4J1E4	G-protein-coupled receptor 39	Gpr39	7.038222638	0
B1AYG7	Integrin beta (Fragment)	Itgb6	6.628899564	0
Q8VI56	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	Lrp4	7.276691529	0
B2RUR8	OTU domain-containing protein 7B	Otd7b	7.483301952	0
P23492	Purine nucleoside phosphorylase	Pnp	7.428296814	0
Q9D620	Rab11 family-interacting protein 1	Rab11fip1	7.305136319	0
E0CYU9	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 homolog	Sssca1	7.657724954	0
D6RH72	Testin (Fragment)	Tes	7.04453976	0
Q8BSB7	Tissue factor pathway inhibitor	Tfpi	6.528145078	0
D3YWB3	Transmembrane channel-like protein	Tmc4	7.724685388	0
Q32NZ6	Transmembrane channel-like protein 5	Tmc5	7.48315921	0
Q9R1Q6	Transmembrane protein 176B	Tmem176b	7.072984745	0
H3BL26	Tetraspanin-6 (Fragment)	Tspan6	7.675595056	0
E9Q6P5	Tetratricopeptide repeat protein 7B	Ttc7b	7.590284404	0
Q9Z2M6	Ubiquitin-like protein 3	Ubl3	7.437909036	0
A0A0U1RP87	Vesicle-associated membrane protein 5	Vamp5	7.451939869	0
Q9CQW1	Synaptobrevin homolog YKT6	Ykt6	7.634578023	0
Q8VCM3	Zinc finger FYVE domain-containing protein 21	Zfyve21	7.092720645	0
F8WIG4	Zinc finger protein ZPR1	Zpr1	7.598024072	0
O54931	A-kinase anchor protein 2	Akap2	8.170261715	7.549861188
D3YVF0	A-kinase anchor protein 5	Akap5	7.076276255	7.781611782
P47739	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	Aldh3a1	7.832508913	8.015778756
Q8BHY3	Anoctamin-1	Ano1	7.643748685	7.439332694
A2AIS9	Arrestin domain-containing protein 1 (Fragment)	Arrdc1	7.805092878	7.928447063
E9Q3G7	Phospholipid-transporting ATPase	Atp11a	6.525692525	6.70457945
Q9DBJ3	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	Baiap2l1	8.360971884	8.354300562
Q9R069	Basal cell adhesion molecule	Bcam	8.224791956	8.225825991
A0A0U1RPF3	Calcium and integrin binding 1 (Calmyrin), isoform CRA_a	Cib1	7.612783857	7.658488381
P56857	Claudin-18	Cldn18	8.365113432	8.400192489
Q9Z0G9	Claudin-3	Cldn3	8.011570444	7.441695136
Q9D7P7	Chloride intracellular channel protein 3	Clic3	8.338854746	8.396722279
D3Z2H7	Catenin delta-1	Ctnnd1	7.261738547	7.166430114
P97792	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	Cxadr	8.250420002	8.197004728
Q9WUD0	Cytochrome P450 2B10	Cyp2b10	7.642266619	7.805432888

Q64462	Cytochrome P450 4B1	Cyp4b1	7.673573796	7.961326156
Q9JMC8	Band 4.1-like protein 4B	Epb411 4b	8.103461622	8.099680641
Q8BGS1	Band 4.1-like protein 5	Epb411 5	8.174059808	8.140193679
Q99K30	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	Eps8l2	7.830652814	7.721480855
P70375	Coagulation factor VII	F7	7.803730171	7.691081492
G5E8C3	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	Gprc5a	9.655906418	9.492341253
A0A0R4J 111	Glutathione peroxidase	Gpx2	8.069298012	7.981592117
G3X9Q3	Histocompatibility (Minor) HA-1, isoform CRA_a	Hmha1	7.552546548	7.298197867
Q8R1H0	Homeodomain-only protein	Hopx	8.182414652	8
Q63ZW7	InaD-like protein	Inadl	7.872331121	7.925724527
Q3TJ91	Lethal(2) giant larvae protein homolog 2	Llg12	7.841984805	7.867467488
P05533	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1	Ly6a	7.996818022	7.832125543
A0A0R4J 0E9	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 2	Mfsd7c	7.15075644	7.269746373
Q9JLB2	MAGUK p55 subfamily member 5	Mpp5	7.927678264	7.999261071
P29595	NEDD8	Nedd8	7.560623875	7.474216264
Q9JK83	Partitioning defective 6 homolog beta	Pard6b	7.805024844	7.856366324
A8Y5F6	Podoplanin	Pdpn	8.344195716	8.201397124
B2RXS4	Plexin-B2	Plxnb2	7.625312451	7.722469386
G5E898	Periplakin	Ppl	7.792321636	7.594060901
Q62074	Protein kinase C iota type	Prkci	7.74647851	7.944087679
A2AWF8	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	Ptpri	7.693551086	7.814846669
D3Z685	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 (Fragment)	Rasgrf2	7.737590166	7.650987094
Q8BSE0	Regulator of microtubule dynamics protein 2	Rmdn2	7.824190941	7.904985881
E9QP76	Rhotekin-2	Rtkn2	7.912381499	7.903252817
D3Z2Y6	Protein S100a16 (Fragment)	S100a1 6	7.390051496	7.668012972
Q8CJC6	Secretoglobulin family 3A member 1	Scgb3a 1	7.313234292	7.552668216
O08797	Protein Serpinb9	Serpinb 9	7.893706293	7.850278553
S4R2L6	Pulmonary surfactant-associated protein B	Sftpb	8.387389826	8.294466226
P21841	Pulmonary surfactant-associated protein C	Sftpc	7.720076573	7.612783857
P50404	Pulmonary surfactant-associated protein D	Sftpd	7.632457292	7.767007364
P49282	Natural resistance-associated macrophage protein 2	Slc11a 2	8.090258053	7.95114316
Q9DBP0	Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	Slc34a 2	8.109240969	7.741387992
Q91W10	Zinc transporter ZIP8	Slc39a 8	7.86711378	7.617524535
Q9JMA9	Sodium- and chloride-dependent neutral and basic amino acid transporter B(0+)	Slc6a1 4	8.589502796	8.456973014
D3YXA8	Solute carrier organic anion transporter family member	Slco3a 1	7.418467021	7.504198919
Q8BGV3	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Tacstd2	7.94767874	7.703635238
Q08189	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Tgm3	7.585235063	8.678062905
P15306	Thrombomodulin	Thbd	7.747411808	7.912222057
F7BWT7	Tetraspanin-15	Tspan1 5	7.736396502	7.648164779
Q8R268	Protein Vmn1r212	Vmn1r 212	7.431041945	7.75327657
Q9Z0K8	Pantetheinase	Vnn1	7.718335579	7.769598848
Q64444	Carbonic anhydrase 4	Ca4	0	7.918397339
B1ARR4	Carbonic anhydrase 6	Car6	0	7.022840611
Q8CEZ4	Uncharacterized protein C2orf54 homolog	CB054	0	7.472610198
P15392	Cytochrome P450 2A4	Cyp2a4	0	7.490941205

F7CXJ2	DnaJ homolog subfamily C member 8 (Fragment)	Dnajc8	0	6.560026249
Q8K0S2	Glutamate-rich protein 5	Erich5	0	6.786751422
Q8BR63	Protein FAM177A1	Fam177a1	0	7.498999364
P26883	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	Fkbp1a	0	8.184691431
Q66VB7	Lacrein	Gm1553	0	7.575880316
D3YXN4	Heme oxygenase 2 (Fragment)	Hmox2	0	6.954676587
Q9EQF2	Kell blood group glycoprotein homolog	Kel	0	8.167021796
Q6PFC5	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 2	Lrit2	0	7.75327657
E9Q6B8	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	Ltbp4	0	7.259115844
Q8BI08	Protein MAL2	Mal2	0	8.053462605
D3Z2V6	Ras-related protein M-Ras (Fragment)	Mras	0	7.665017825
Q9Z183	Protein-arginine deiminase type-4	Padi4	0	7.135768515
Q9Z0P4	Paralemmin-1	Palm	0	7.556784782
P02816	Prolactin-inducible protein homolog	Pip	0	7.84460142
D3Z7J3	Phospholipid scramblase 2	Plscr2	0	8.2955671
Q3V341	Protein kinase C zeta type	Prkcz	0	7.410945859
Q8CIF6	SID1 transmembrane family member 2	Sidt2	0	8.169968174
Q9EPT5	Solute carrier organic anion transporter family member 2A1	Slco2a1	0	7.853393977
A2A6M1	Vacuolar-sorting protein SNF8	Snf8	0	7.340245762
F6SLR4	Testican-2	Spock2	0	7.749813585
G3UXF1	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	Tmcc1	0	8.482873584
P97765	WW domain-binding protein 2	Wbp2	0	7.817763632
Q9DBH0	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2	Wwp2	0	7.648164779

Tabela S8: Proteínas exossomais exclusivas do cérebro.

Accession	Description	GN	Sed Brain (LOG ₁₀ expression)	Exer Brain (LOG ₁₀ expression)
E0CYV9	Protein 1110002E22Rik	1110002E22Rik	8.559068334	0
A0A087WR90	Abl interactor 2 (Fragment)	Abi2	7.926136571	0
A0A087WQB7	Abelson tyrosine-protein kinase 2 (Fragment)	Abi2	7.582177038	0
Q8VHQ9	Acyl-coenzyme A thioesterase 11	Acot11	7.788945727	0
P63002	Amino-terminal enhancer of split	Aes	7.030194785	0
H3BJ70	Protein argonaute-1 (Fragment)	Ago1	7.125806458	0
E9Q0A3	Protein Arhgef11 (Fragment)	Arhgef11	7.817036226	0
Q9D1K2	V-type proton ATPase subunit F	Atp6v1f	7.937317248	0
E9QKH8	Catenin delta-2	Ctnd2	6.958707191	0
Q6P5E8	Diacylglycerol kinase theta	Dgkq	7.571242851	0
Q8BWT5	Disco-interacting protein 2 homolog A	Dip2a	7.606918526	0
A0A0A6YY05	Diphthine methyltransferase	Dph7	7.10002573	0
D3YU63	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	Enpp6	7.446226402	0
Q00558	Factor VIII intron 22 protein	F8a1	7.872389388	0
D6RGR3	Glomulin	Glmn	7.388633969	0
P63216	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3	Gng3	8.222456337	0
K3W4Q9	Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein	Gopc	7.015359755	0
Q8BGC0	HIV Tat-specific factor 1 homolog	Htatsf1	7.904228516	0
E9QLA5	Inverted formin-2	Inf2	7.576110894	0
Q8CDA1	Phosphatidylinositol phosphatase SAC2	Inpp5f	7.045714059	0

Q5RJG7	Isoprenoid synthase domain-containing protein	Ispd	7.502836639	0
A2AHX4	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1 (Fragment)	Lrsam1	6.922414024	0
Q9WUC3	Lymphocyte antigen 6H	Ly6h	7.656385719	0
E9PYX7	Afadin	Mllt4	7.222456337	0
B1AQF7	MAGUK p55 subfamily member 3	Mpp3	7.218535505	0
P28184	Metallothionein-3	Mt3	6.842734019	0
E9Q175	Unconventional myosin-VI	Myo6	6.666424373	0
A0A0R4I ZX5	Neurocan core protein	Ncan	7.668199484	0
B7ZC23	Nuclear receptor coactivator 5	Ncoa5	7.846893543	0
A0A087 WNW2	Neurofascin	Nfasc	7.656960183	0
P60761	Neurogranin	Nrgn	7.22762965	0
Q63912	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein	Omg	7.565611725	0
Q8K2H2	OTU domain-containing protein 6B	Otud6b	7.678973376	0
Q61644	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	Pacsin1	7.548389418	0
A3KGC5	Serine/threonine-protein kinase PAK 3 (Fragment)	Pak3	7.755951041	0
P83870	PHD finger-like domain-containing protein 5A	Phf5a	7.887392219	0
D3YZ98	Phosphatidylinositol 3-kinase	Pik3c3	7.115610512	0
E9QMI6	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B (Fragment)	Prpf40b	7.07114529	0
E9PUL5	Proline-rich transmembrane protein 2	Prrt2	7.550839605	0
A2A4W9	RNA-binding protein fox-1 homolog 3 (Fragment)	Rbfox3	8.292699003	0
Q8JZX4	Splicing factor 45	Rbm17	8.320769228	0
Q8BVY0	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	Rsl1d1	8.122870923	0
D3YXK2	Scaffold attachment factor B1	Safb	7.116275588	0
O88745	Scrapie-responsive protein 1	Scrg1	7.190891717	0
Q9DB90	Protein SMG9	Smg9	7.142389466	0
Q8BTI8	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Srrm2	7.388456453	0
A0A0U1 RPW2	Tight junction protein ZO-1	Tjp1	7.503790683	0
Q9Z0U1	Tight junction protein ZO-2	Tjp2	7.527887566	0
Q99MX0	Transketolase-like protein 1	Tktl1	7.634880141	0
Q8BYI9	Tenascin-R	Tnr	8.719993826	0
Q9DCC8	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	Tomm20	8.08170727	0
Q0KL02	Triple functional domain protein	Trio	7.301680949	0
A0A0B4J 1N9	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 (Fragment)	Trip12	7.07371835	0
A0A0U1 RPU8	Protein tweety homolog 1	Ttyh1	7.893650817	0
Q8VHI6	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3	Wasf3	7.281941933	0
F6RIG8	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3 (Fragment)	Wdr45b	7.91944421	0
Q924Z6	Exportin-6	Xpo6	7.910517686	0
Q3TA40	Protein 6430548M08Rik	6430548 M08Rik	8.028164419	8.135132651
E9PUE7	Active breakpoint cluster region-related protein	Abr	8.132579848	8.213783299
Q99PU5	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	Acsbg1	8.812712867	8.661149857
F8VQE9	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3	Agap3	7.577606677	7.717087725
Q920P5	Adenylate kinase isoenzyme 5	Ak5	7.497067936	7.451018452
Q8C8R3	Ankyrin-2	Ank2	8.003029471	7.921998431
A0A0R4J 2A6	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B	Anks1b	8.231979027	8.311329952
B2RUJ5	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1	Apba1	6.775756038	7.122215878
D3Z2F3	Arfaptin-2 (Fragment)	Arfp2	7.203576775	7.393575203
E9QAQ3	Rho GTPase-activating protein 26	Arhgap26	7.863382348	7.98403198
Q811P8	Rho GTPase-activating protein 32	Arhgap32	7.91619066	7.913654935

Q91YM2	Rho GTPase-activating protein 35	Arhgap35	7.660201201	7.708930536
P97393	Rho GTPase-activating protein 5	Arhgap5	7.773054693	7.960280464
A0A0G2J EU6	Rho guanine nucleotide exchange factor 9 (Fragment)	Arhgef9	7.279210513	7.388988785
J3QNU1	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	Ate1	7.702430536	7.682596291
P14231	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2	Atp1b2	8.263162465	7.857814778
K3W4T3	V-type proton ATPase subunit a	Atp6v0a1	8.26245109	8.409087369
Q9WTT4	V-type proton ATPase subunit G 2	Atp6v1g2	8.296884476	8.159867847
Q61687	Transcriptional regulator ATRX	Atrx	7.407390904	7.856970433
E9Q5Q0	Ataxin-2-like protein (Fragment)	Atxn2l	7.883207033	8.294686624
Q61361	Brevican core protein	Bcan	8.329194415	8.085290578
P24288	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	Bcat1	8.514149134	8.75671216
F6SZ47	Serine/threonine-protein kinase B-raf (Fragment)	Braf	7.60184279	7.828015064
G3UXM5	Serine/threonine-protein kinase BRSK2 (Fragment)	Brsk2	7.773786445	7.844787719
Q80TJ1	Calcium-dependent secretion activator 1	Cadps	8.432969291	8.784831178
A0A0G2J ET2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (Fragment)	Camkk2	7.932270776	8.048053173
Q3UHL1	CaM kinase-like vesicle-associated protein	Camkv	8.548880563	8.642266619
Q8C1B1	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2	Camsap2	7.582063363	7.561935763
Q61686	Chromobox protein homolog 5	Cbx5	7.721315881	7.625106575
P61809	Cyclin-dependent kinase 5 activator 1	Cdk5r1	7.830267801	8.145507171
Q8BI72	CDKN2A-interacting protein	Cdkn2aip	7.706973676	7.665956029
Q7TSY6	CUGBP Elav-like family member 4	Celf4	7.159567193	7.6599162
Q9JKC6	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	Cend1	7.304059466	7.706632451
Q0VEJ0	Centrosomal protein of 76 kDa	Cep76	7.685114469	7.972110228
Z4YL78	Cytoskeleton-associated protein 5	Ckap5	7.991447598	8.084933575
Q9CWN7	CCR4-NOT transcription complex subunit 11	Cnot11	7.848804701	7.768638101
P12960	Contactin-1	Cntn1	7.907088745	7.549248557
Q8BH44	Coronin-2B	Coro2b	8.196176185	8.448242413
F6T0J8	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3 (Fragment)	Cpeb3	7.948119424	8.058805487
Q8BTV2	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	Cpsf7	7.585235063	7.964023793
Q8R555	Cartilage acidic protein 1	Crtac1	7.541828767	7.544935766
Q9QX11	Cytohesin-1	Cyth1	7.615529224	7.829239428
D3YU96	Cytohesin-2	Cyth2	7.679972694	7.849971912
Q9QXS6	Drebrin	Dbn1	9.102433706	9.202215776
A0A0G2J GQ6	Serine/threonine-protein kinase DCLK1	Dclk1	8.451018452	8.613101517
Q6PGN3	Serine/threonine-protein kinase DCLK2	Dclk2	8.15715444	8.273695588
F6XW16	Dynactin subunit 6 (Fragment)	Dctn6	7.808548551	7.703033305
D3Z0M9	MCG18410, isoform CRA_a	Ddx23	7.629817196	7.832572775
Q569Z5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	Ddx46	8.020775488	7.801815169
A2RSQ0	DENN domain-containing protein 5B	Dennd5b	7.2955671	8.579440597
D3YYP5	Non-syndromic hearing impairment protein 5 homolog	Dfna5	7.673481697	7.815976001
F2Z409	Diacylglycerol kinase gamma	Dgkg	7.226599905	7.465382851
Q80UP3	Diacylglycerol kinase zeta	Dgkz	7.564902673	7.885756881
Q91Z61	GTP-binding protein Di-Ras1	Diras1	7.572290606	7.76305344
Q5PR73	GTP-binding protein Di-Ras2	Diras2	8.118264726	8.15715444
Q8BPN8	DmX-like protein 2	Dmxl2	7.824060717	8.237292338
A0A0G2J EI3	DnaJ homolog subfamily B member 6	Dnajb6	7.123851641	7.601734148
Q80TZ3	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	Dnajc6	8.383994789	8.563836919
Q9QYI3	DnaJ homolog subfamily C member 7	Dnajc7	8.406028945	8.438225808
Q05A62	Dynein light chain 1, axonemal	Dnal1	7.781539969	7.765445018
H3BJT3	Double C2-like domain-containing protein alpha (Fragment)	Doc2a	7.865518519	7.874481818
O35098	Dihydropyrimidinase-related protein 4	Dpysl4	8.610553705	8.795114986
Q9QXB9	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2	Drg2	7.834802054	8.026941628

A0A0R41ZY9	tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)]	Dus3l	7.349471799	7.948021533
Q3UR02	ELAV-like protein	Elavl2	8.669223874	8.732634968
Q60900	ELAV-like protein 3	Elavl3	8.669223874	8.732634968
Q8BVA9	ELAV-like protein	Elavl4	8.669223874	8.735519059
P51880	Fatty acid-binding protein, brain	Fabp7	7.842484424	7.833274639
Q6RI63	Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Fam120b	7.183839037	7.515476441
Q8C3F2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 2	Fam120c	8.332034277	7.910944406
Q5XG69	Soluble lamin-associated protein of 75 kDa	Fam169a	8.117271296	8.241546481
A2RT62	F-box/LRR-repeat protein 16	Fbxl16	8.305136319	8.615107987
F8VQK6	Protein Fbxl18	Fbxl18	7.713070326	7.793650718
Q80UW2	F-box only protein 2	Fbxo2	8.697054892	8.776483256
E9PUJ0	F-box only protein 44	Fbxo44	7.866169148	7.917242858
P61329	Fibroblast growth factor 12	Fgf12	7.689575216	7.769155691
Q7TPM6	Fibronectin type III and SPRY domain-containing protein 1	Fsd1	7.935708748	8.091666958
E0CXZ1	FSD1-like protein (Fragment)	Fsd11	7.589837943	7.540329475
Q8BGW1	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	Fto	7.427648371	7.816042341
P48318	Glutamate decarboxylase 1	Gad1	8.098297536	8.355259906
P48320	Glutamate decarboxylase 2	Gad2	7.89965638	8.219846386
Q9R111	Guanine deaminase	Gda	7.520352504	7.728759475
Q3TRG0	Gene model 1604B, (NCBI)	Gm1604a	7.517855419	7.8192148
B0LM42	Protein Gm21992	Gm21992	8.139879086	7.87279704
P62881	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5	Gnb5	8.293362555	8.511883361
Q99JG2	Prosaposin receptor GPR37L1	Gpr37l1	8.109915863	7.672282625
F8WJ74	GRAM domain-containing protein 1A	Gramd1a	7.913442955	8.047664195
Q80TI0	GRAM domain-containing protein 1B	Gramd1b	7.860936621	8.113943352
G3UYD0	General transcription factor II-I	Gtf2i	7.48756256	7.574031268
Q3U0D9	E3 ubiquitin-protein ligase HACE1	Hace1	7.608632989	7.900421753
Q9JKY5	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	Hip1r	7.310268367	8.534406899
F2Z3Z1	Hippocalcin-like protein 4 (Fragment)	Hpcal4	7.98788961	7.890979597
Q7TT37	Elongator complex protein 1	Ikbkap	7.454692449	7.634074025
Q9Z1X4	Interleukin enhancer-binding factor 3	Ilf3	8.46686762	8.159266331
O55091	Protein IMPACT	Impact	8.574494268	8.412292509
Q8R071	Inositol-trisphosphate 3-kinase A	Itpka	8.212720154	8.293362555
P11881	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	Itpr1	7.730862992	7.943247125
Q9Z0R4	Intersectin-1	Itsn1	7.919601024	8.160768562
Q8BG40	Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1	Katnb1	8.039017322	7.873843533
E9QAN4	Kinesin-like protein	Kif1a	8.046104787	8.059184618
Q6ZPU9	KIF1-binding protein	Kif1bp	7.630020851	7.980548739
F8WGN6	Kinesin-like protein	Kif21a	8.003891166	8.044931546
D3Z5B8	Protein very KIND (Fragment)	Kndc1	7.137670537	7.392696953
Q9CR70	EKC/KEOPS complex subunit Lage3	Lage3	7.84460142	7.859378504
Q6ZQ58	La-related protein 1	Larp1	6.917820482	7.272537777
Q05CL8	La-related protein 7	Larp7	7.011570444	6.757168192
F6V2R5	Tyrosine-protein kinase receptor	Ltk	8.036628895	8.304490528
A0A0R4J047	Luc7 homolog (S. cerevisiae)-like, isoform CRA_c	Luc7l	8.386142109	8.147367108
Q5SUF2	Luc7-like protein 3	Luc7l3	7.931254406	7.812043898
A2AS33	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD2	MacroD2	8.194514342	8.05422991
A2AGQ2	MAP kinase-activating death domain protein	Madd	7.153814864	7.758836225
P14873	Microtubule-associated protein 1B	Map1b	8.872272846	8.659535907
Q91VR7	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	Map1lc3a	8.391464412	8.578753784
P20357	Microtubule-associated protein 2	Map2	8.18723862	8.154119526
B7ZNR9	Map4k4 protein	Map4k4	8.197004728	7.996073654

D3Z6W1	Microtubule-associated protein 6	Map6	7.934245881	8.226084116
Q03141	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	Mark3	7.937066312	7.992332559
F6WZH1	Methyl-CpG-binding domain protein 3 (Fragment)	Mbd3	7.009025742	7.378397901
F6ZIA4	Myelin basic protein (Fragment)	Mbp	8.468790262	7.959709024
Q9JM52	Misshapen-like kinase 1	Mink1	8.197004728	8.103803721
Q9WV34	MAGUK p55 subfamily member 2	Mpp2	8.585235063	8.796366155
E9PUB7	Protein misato homolog 1	Msto1	7.676876432	7.799685091
Q9Z2C4	Myotubularin-related protein 1	Mtmr1	7.708250889	7.843793198
A2ATP5	Myelin expression factor 2	Myef2	8.238798563	8.380753771
D3YZ62	Unconventional myosin-Va	Myo5a	7.818489822	7.717254313
E9Q1I2	SS complex subunit B1 (Fragment)	Nabp2	7.639586087	7.725503269
P28663	Beta-soluble NSF attachment protein	Napb	8.15624619	8.136720567
Q9CWZ7	Gamma-soluble NSF attachment protein	Napg	7.980367026	7.865044722
Q9EPN1	Neurobeachin	Nbea	7.551449998	7.566673138
Q8BTG7	Protein NDRG4	Ndrp4	8.111598525	8.165837625
A2AGI3	Neuroigin-3	Nlgn3	7.515343893	7.048441804
B0F2B4	Neuroigin 4-like	Nlgn4l	7.877659244	8.142389466
S4R255	Nitric oxide synthase	Nos1	7.616160313	7.561697533
Q8R2U4	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	Ntmt1	7.515608949	7.755417463
P15209	BDNF/NT-3 growth factors receptor	Ntrk2	8.170261715	8.320769228
P0C028	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 3-beta	Nudt11	8.536305872	8.347915187
Q8R2U6	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	Nudt4	8.567144045	8.320769228
Q3U0K8	Prolyl 3-hydroxylase OGFOD1	Ogfod1	7.904661458	7.537567257
Q99J31	Oligophrenin-1	Ophn1	7.195068996	7.415807728
V9GXX3	Oxysterol-binding protein (Fragment)	Osbp16	7.754424789	7.925157327
D3YUB9	Polyadenylate-binding protein 2 (Fragment)	Pabpn1	8.290479813	7.07773118
Q8K212	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	Pacs1	8.679609572	7.902872785
P59913	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-containing protein 1	Pcmdt1	7.636086515	7.721893016
Q9QXV0	ProSAAS	Pcsk1n	6.616895426	6.686010291
P21661	Neuroendocrine convertase 2	Pcsk2	7.907088745	8.165244326
Q01065	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	Pde1b	8.781036939	8.723537762
G3UZ46	Protein Pde4b	Pde4b	6.879439966	6.601516784
Q3TRL2	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	Pdpk1	8.178401342	8.184975191
E9QPI5	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	Pds5a	7.820595497	7.852906759
F8SLP9	PEX5-related protein	Pex5l	7.594282029	7.724521627
Q80TL4	PHD finger protein 24	Phf24	8.703205371	8.757623746
Q8BGT8	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like	Phyhipl	9.159266331	9.239299479
Q9QUR7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	Pin1	7.80078579	8.204391332
O70161	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	Pip5k1c	7.904011884	7.935104021
O35954	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1	Pitpnm1	7.96449534	8.052693942
Q3USB7	Inactive phospholipase C-like protein 1	Plcl1	7.755646219	7.79761373
P60202	Myelin proteolipid protein	Plp1	9.302547372	8.741466762
Q8CJH3	Plexin-B1	Plxnb1	7.948901761	7.792111409
Q80TL0	Protein phosphatase 1E	Ppm1e	7.896911841	7.957703042
Q3UYC0	Protein phosphatase 1H	Ppm1h	7.654850091	7.595385981
Q8C0Y0	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4	Ppp4r4	7.748808005	7.839163683
Q8C167	Prolyl endopeptidase-like	Prepl	7.948999454	8.068556895
Q69ZK0	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	Prex1	7.770852012	7.923295841
Q61136	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	Prpf4b	7.607562243	7.312177356
E9PUC5	PH and SEC7 domain-containing protein 3	Psd3	8.35564305	8.470557485
Q8R326	Paraspeckle component 1	Pspc1	8.086715664	8.16613397
O08586	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	Pten	7.748575617	7.928447063

E9Q2A6	Protein-tyrosine kinase 2-beta	Ptk2b	8.069668097	8.142076461
P54830	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 5	Ptpn5	8.437116093	8.472463897
Q8R361	Rab11 family-interacting protein 5	Rab11fip5	7.749504424	7.789157492
P35288	Ras-related protein Rab-23	Rab23	7.589502796	7.678609417
Q8BHH2	Ras-related protein Rab-9B	Rab9b	7.855942946	7.804820679
B0R0S4	Rab9 effector protein with kelch motifs	Rabepk	7.385784959	7.374381698
Q8C570	mRNA export factor	Rae1	7.67651071	7.940018155
A2ALS5	Rap1 GTPase-activating protein 1	Rap1gap	8.255513713	8.355259906
A0A0A6 YWG7	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	Rapgef2	7.59206567	8.064083436
E9QL13	MCG8382, isoform CRA_c	Rbm14	8.139879086	8.025715384
Q8VCD6	Receptor expression-enhancing protein 2	Reep2	7.37401474	7.590618948
A0A087 WSJ9	Regulator of G-protein-signaling 6	Rgs6	7.792531762	7.979275148
O54829	Regulator of G-protein signaling 7	Rgs7	7.856608068	8.039810554
Q921Q7	Ras and Rab interactor 1	Rin1	6.641275757	6.940317222
Q9JI90	E3 ubiquitin-protein ligase RNF14	Rnf14	7.617314933	7.512684396
Q9D394	Protein RUFY3	Rufy3	7.812244697	7.935204867
Q6ZPE2	Myotubularin-related protein 5	Sbf1	7.373095987	7.647285145
Q9JKD3	Secretory carrier-associated membrane protein 5	Scamp5	7.517063873	7.796990391
A0A0N4 SWD0	Secernin-1 (Fragment)	Scrn1	7.977266212	7.960375631
Q62420	Endophilin-A1	Sh3gl2	7.794209116	8.472610198
D3YZU5	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	Shank1	7.788804493	7.729569726
Q91V14	Solute carrier family 12 member 5	Slc12a5	8.310905629	8.351409752
A0A0R4J 0A6	Solute carrier family 17 (Sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6, isoform CRA_a	Slc17a6	8.207365037	8.176091259
Q3TXX4	Vesicular glutamate transporter 1	Slc17a7	8.090610708	8.095169351
A2APL5	Amino acid transporter	Slc1a2	8.511348515	7.947433722
P56564	Excitatory amino acid transporter 1	Slc1a3	8.379486814	7.712481338
O35633	Vesicular inhibitory amino acid transporter	Slc32a1	8.088136089	8.002166062
P31650	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 3	Slc6a11	8.050379756	7.920801382
Q8BUN5	Mothers against decapentaplegic homolog 3	Smad3	7.504878459	7.771954749
E9QAB8	Probable global transcription activator SNF2L2	Smarca2	7.994009033	8.054995862
P60879	Synaptosomal-associated protein 25	Snap25	8.320354033	8.162265614
B2FDF6	Synaptosomal-associated protein 47	Snap47	7.900858505	7.875928985
Q8BVL3	Sorting nexin-17	Snx17	7.826593054	7.949780208
P16254	Signal recognition particle 14 kDa protein	Srp14	7.813714392	7.80078579
Q9QZX7	Serine racemase	Srr	8.140508043	8.282848603
Q6PDM2	Serine/arginine-rich splicing factor 1	Srsf1	8.088136089	8.297541668
Q3TFP0	Serine/arginine-rich-splicing factor 10	Srsf10	8.115277591	7.99206726
Q3UIX4	Protein Srsf11	Srsf11	8.071882007	7.783546282
E2QRQ3	Double-stranded RNA-binding protein Staufin homolog 2	Stau2	6.95966137	6.703807065
Q8QZV4	Serine/threonine-protein kinase 32C	Stk32c	7.711807229	7.762078087
Q91WM1	Spermatid perinuclear RNA-binding protein	Strbp	8.314920056	7.992995098
A0A0J9Y UA0	Syntaxin-1A (Fragment)	Stx1a	7.993876915	7.995679061
P61264	Syntaxin-1B	Stx1b	8.266231697	8.046885191
Q8R3T5	Syntaxin-binding protein 6	Stxbp6	7.535420718	7.923658422
P63046	Sulfotransferase 4A1	Sult4a1	8.726971584	8.875755579
Q9JIS5	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	Sv2a	8.381115081	8.295127085
Q8BG39	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	Sv2b	7.807196661	7.870052582
Q80X82	Symplesin	Sympk	7.434728542	7.738066715
Q64332	Synapsin-2	Syn2	8.88155583	9.084218687
Q8JZP2	Synapsin-3	Syn3	8.405175546	8.429429264

A0A0A6YVS6	Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP (Fragment)	Syngap1	7.910464316	7.884568815
Q8R191	Synaptogyrin-3	Syng3	8.561220679	8.60948769
Q62277	Synaptophysin	Syp	8.78518742	8.826981337
P46096	Synaptotagmin-1	Syt1	8.489958479	8.431041945
A0A0R4J2C2	Synaptotagmin II	Syt2	8.2509077	8.182984967
Q8CF89	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	Tab1	7.133858125	7.544935766
P62340	TATA box-binding protein-like protein 1	Tbp1l	7.089905111	7.737113094
Q91YJ3	Thymocyte nuclear protein 1	Thyn1	7.911370707	8.051923916
E0CXD6	Traf2 and NCK-interacting protein kinase	Tnik	8.197004728	7.961800639
Q9CZW5	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	Tomm70a	7.634678752	7.545430829
Q7TQD2	Tubulin polymerization-promoting protein	Tppp	8.342027688	8.393048466
A0A0N4SVC2	Transformer-2 protein homolog alpha	Tra2a	7.938269483	8.000434077
Q9ESN6	Tripartite motif-containing protein 2	Trim2	8.011570444	7.904174368
Q80XC2	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A	Trmt61a	7.598243192	7.642662331
P38585	Tubulin--tyrosine ligase	Ttl	7.930949031	7.978317497
Q99KD5	Protein unc-45 homolog A =Mus musculus GN=Unc45a PE=1 SV=2 - [UN45A_MOUSE]	Unc45a	7.176958981	7.485295439
Q80U87	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	Usp8	7.169380495	7.733036683
Q8CI71	Syndetin	Vps50	7.731508184	7.786467477
P62761	Visinin-like protein 1	Vsn1l	8.389697548	8.244524512
Q8CBE3	WD repeat-containing protein 37	Wdr37	8.014520539	8.209515015
Q8CGF6	WD repeat-containing protein 47	Wdr47	7.990161193	8.142389466
Q920I9	WD repeat-containing protein 7	Wdr7	8.029383778	7.768860001
P83741	Serine/threonine-protein kinase WNK1	Wnk1	7.688419822	7.728110184
Q91XU0	ATPase WRNIP1	Wrnip1	6.944383958	7.018284308
O88532	Zinc finger RNA-binding protein	Zfr	7.916927466	8.039810554
Q9DC29	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	Abcb6	0	8.589279221
E9Q0W6	Actin-binding LIM protein 2	Ablim2	0	7.95371138
Q91ZS8	Double-stranded RNA-specific editase 1	Adarb1	0	7.655042341
O88573	AF4/FMR2 family member 1	Aff1	0	8.218535505
E9Q3K3	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	Agap1	0	7.779091204
Q8C4Q6	Axin interactor, dorsalization-associated protein	Aida	0	7.739018246
Q9DBT5	AMP deaminase 2	Ampd2	0	7.430236353
Q3TPE9	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2	Ankmy2	0	7.807737922
S4R203	Rho GTPase-activating protein 12	Arhgap12	0	7.499136995
D3Z0V2	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	Arhgef7	0	7.611510887
E9Q4N6	Protein Arid1b	Arid1b	0	7.27600199
Q8BHS6	Armadillo repeat-containing X-linked protein 3	Armxc3	0	7.58591171
E9PU93	Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	Ash2l	0	7.386142109
Q80U56	Late secretory pathway protein AVL9 homolog	Avl9	0	7.749272408
V9GXD7	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Fragment)	Camsap1	0	7.638888425
Q6P9K8	Caskin-1	Caskin1	0	7.477410688
Q6A068	Cell division cycle 5-like protein	Cdc5l	0	7.681783766
Q8C6E0	Cilia- and flagella-associated protein 36	Cfap36	0	7.609807769
Q3V2R3	Beta-chimaerin	Chn2	0	7.958945932
G3UWX2	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4 (Fragment)	Cog4	0	7.667079205
Q9EPU4	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	Cpsf1	0	7.746322765
Q9QXK7	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	Cpsf3	0	7.269979677
H7BXB1	Casein kinase I isoform alpha =Mus musculus GN=Csnk1a1 PE=1 SV=1 - [H7BXB1_MOUSE]	Csnk1a1	0	7.900093902
Q61164	Transcriptional repressor CTCF	Ctcf	0	7.439332694

Q62018	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	Ctr9	0	7.864985461
B9EJA2	Cortactin-binding protein 2	Ctnbp2	0	7.610553705
Q9D1F0	CAAX box 1 homolog A (Human)	Cxx1b	0	7.574956776
Q9CXV9	DCN1-like protein 5	Dcn1d5	0	7.539452492
Q3UVU8	Disks large-associated protein 1	Dlgap1	0	7.433769834
A0A0R4J055	Dynamin-binding protein	Dnmbp	0	7.983941859
Q8K2D3	Enhancer of mRNA-decapping protein 3	Edc3	0	7.853454841
M0QWD1	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2 (Fragment)	Eif4e2	0	7.851991748
D3YUE4	Protein Fam151b	Fam151b	0	7.44294987
Q6PDI6	Protein FAM63B	Fam63b	0	7.64384731
Q68FE6	Protein FAM65A	Fam65a	0	7.401917251
Q6PDJ6	F-box only protein 42	Fbxo42	0	6.963268252
A2AHW8	GTPase-activating Rap/Ran-GAP domain-like protein 3	Garnl3	0	7.028164419
O08582	GTP-binding protein 1	Gtpbp1	0	7.720655357
B7ZDF7	Histone deacetylase	Hdac5	0	7.017033339
Q8BIL5	Protein Hook homolog 1	Hook1	0	7.307496038
Q8R0S2	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1	Iqsec1	0	7.638788667
Q8K3X4	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like	Irf2bpl	0	7.60184279
Q8BYN3	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	Itpk1	0	7.706376356
G5E8P9	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1 (Fragment)	Katnal1	0	7.462248215
Q8C2E7	WASH complex subunit strumpellin	Kiaa0196	0	7.196728723
Q8CD19	LanC-like protein 3	Lanc13	0	7.718169405
Q8K406	Leucine-rich repeat LGI family member 3	Lgi3	0	7.430236353
F6PZ73	LIM domain kinase 1 (Fragment)	Limk1	0	7.821971818
Q9D0R8	Protein LSM12 homolog	Lsm12	0	7.893761762
Q6A009	E3 ubiquitin-protein ligase listerin	Ltn1	0	7.449324093
Q14BB9	MAP6 domain-containing protein 1	Map6d1	0	7.613841822
D3Z0Q4	Methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein	Mthfsd	0	6.803320524
Q9Z2D0	Myotubularin-related protein 9	Mtmr9	0	7.626648268
Q9DC07	LIM zinc-binding domain-containing Nebulette	Neb1	0	8.129367596
Q3TN15	Serine/threonine-protein kinase Nek7	Nek7	0	7.714245911
Q8C4Y3	Negative elongation factor B	Nelfb	0	7.476396827
Q04690	Neurofibromin	Nf1	0	7.398634325
Q8R480	Nuclear pore complex protein Nup85	Nup85	0	10.06145248
F7CXD5	Poly(A) polymerase alpha (Fragment)	Papola	0	7.462996612
Q91XW9	MCG133388, isoform CRA_f	Pcdhgc5	0	7.76064862
D3Z4V1	Pleiotropic regulator 1	Plrg1	0	8.206556044
A2ALM3	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1B (Fragment)	Pnck	0	7.392345155
G3UXX5	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1 (Fragment)	Polr1c	0	7.311329952
Q9WTX2	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A	Prkra	0	7.460296327
Q922U1	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	Prpf3	0	7.821775467
Q80SY5	Pre-mRNA-splicing factor 38B	Prpf38b	0	7.665017825
P28828	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	Ptpm	0	6.858537198
Q3TIR3	Synembryn-A	Ric8a	0	7.498172661
Q8BFU3	RING finger protein 214	Rnf214	0	7.108565024
Q3TDK6	Protein rogdi homolog	Rogdi	0	7.635383204
Q9JKY0	Cell differentiation protein RCD1 homolog	Rqcd1	0	7.7182525
P56183	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A	Rrp1	0	6.874713689
D3YXC9	Rhotekin (Fragment)	Rtkn	0	7.056142262
Q8QZY9	Splicing factor 3B subunit 4	Sf3b4	0	7.649432223
F6U8X4	Serine/threonine-protein kinase SIK3 (Fragment)	Sik3	0	7.722962809

Q61466	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1	Smarcd1	0	7.637689819
J3QQ22	Serine/threonine-protein kinase SMG1	Smgl	0	7.310055738
Q62241	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	Snrpc	0	7.643945913
Q6NZL0	Protein SOGA3	Soga3	0	8.038222638
Q62245	Son of sevenless homolog 1	Sos1	0	7.463743721
S4R2C4	Son of sevenless homolog 2	Sos2	0	7.566437492
E9QN14	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3	Srgap3	0	7.517063873
Q9CYZ8	Single-stranded DNA-binding protein 2	Ssbp2	0	7.664923893
Q9WTK7	Serine/threonine-protein kinase STK11	Stk11	0	7.419460073
B1AR92	STE20-related kinase adapter protein alpha (Fragment)	Strada	0	7.401572846
P70279	Surfeit locus protein 6	Surf6	0	8.476686743
E9QAF9	Protein TANC1	Tanc1	0	7.36398783
Q5F2E8	Serine/threonine-protein kinase TAO1	Taok1	0	7.958038016
A0A0U1 RPN1	TBC1 domain family member 10B (Fragment)	Tbc1d10b	0	7.705436047
E0CZ81	Tubulin-specific chaperone E	Tbce	0	7.504470862
D3YZ08	Telomeric repeat-binding factor 2	Terf2	0	7.144885418
Q9ERA6	Tuftelin-interacting protein 11	Tfip11	0	7.448397103
G3UWG2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Tiam1	0	7.735199548
Q5SXA5	TOM1-like protein 2	Tom1l2	0	7.980684974
A2AU89	Tumor suppressor p53-binding protein 1	Trp53bp1	0	7.590953235
D3Z485	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3 (Fragment)	Ttc3	0	7.817036226
Q3V038	Tetratricopeptide repeat protein 9A	Ttc9	0	7.769820258
Q6P3Y6	Tetratricopeptide repeat protein 9C	Ttc9c	0	7.670245853
E9Q0R3	Gamma-tubulin complex component 3	Tubgcp3	0	7.868174041
A0A087 WR93	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein (Fragment)	U2surp	0	7.396548038
D3YVU0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 46	Usp46	0	7.167021796
Q8K4P0	pre-mRNA 3' end processing protein WDR33	Wdr33	0	7.755341184
Q60596	DNA repair protein XRCC1	Xrcc1	0	7.433129518
A0S860	Protein Zfyve9	Zfyve9	0	7.490800952
Q8CIE2	Zinc finger MIZ domain-containing protein 2	Zmiz2	0	7.904661458
A2A486	Protein Zmynd8 (Fragment)	Zmynd8	0	7.299725154

Tabela S9: Proteínas exossomais exclusivas do rim.

Accession	Description	GN	Sed Kidney (LOG ₁₀ expression)	Exer Kidney (LOG ₁₀ expression)
Q9Z0F8	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	Adam17	7.755035934	0
A0A0G2JFB 8	Pro-epidermal growth factor	Egf	7.632760888	0
E0CY77	EMI domain-containing protein 1	Emid1	7.403120521	0
D3Z1H0	Protein eva-1 homolog C (Fragment)	Evalc	6.920697134	0
Q9QZF2	Glypican-1	Gpc1	7.31868927	0
E0CYW7	Hepatoma-derived growth factor	Hdgf	7.304059466	0
Q9Z0Z4	Hephaestin	Heph	7.42143939	0
O35082	Klotho	Kl	7.55339751	0
P16301	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	Lcat	7.554731377	0
Q8BZT5	Leucine-rich repeat-containing protein 19	Lrrc19	7.51600623	0
P55002	Microfibrillar-associated protein 2	Mfap2	7.923244019	0
Q3V1L4	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	Nt5c2	7.354684554	0
O55134	Protocadherin-12	Pcdh12	7.043755127	0
A0A0A6YW M6	Protein Pcdhgc3	Pcdhgc3	6.830267801	0

Q9CQH0	PDZK1-interacting protein 1	Pdzkli p1	7.771954749	0
P33587	Vitamin K-dependent protein C	Proc	7.373831145	0
Q3UQ28	Peroxidasin homolog	Pxdn	7.521399628	0
Q61493	DNA polymerase zeta catalytic subunit	Rev3l	8.616475514	0
Q8C3K6	Sodium/glucose cotransporter 1	Slc5a1	7.265760917	0
D6RJ80	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT1	Slc6a1 9	7.39375064	0
F6TTF6	Sodium- and chloride-dependent transporter XTRP3B (Fragment)	Slc6a2 0b	6.636387586	0
G3X909	Slit homolog 2 protein	Slit2	6.498310554	0
A2A4U6	Protein Zfp334	Zfp334	7.494015375	0
Q8KOL3	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2, mitochondrial	Acsm2	9.376029182	9.703892954
P11859	Angiotensinogen	Agt	8.02201574	7.923710194
O08691	Arginase-2, mitochondrial	Arg2	8.067442843	8.317854489
Q8JZV9	3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	Bdh2	7.935003151	8.149834697
Q99N23	Carbonic anhydrase 15	Ca15	8.077004327	8.104828404
Q9QZA0	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	Ca5b	7.252853031	7.822756333
O89103	Complement component C1q receptor	Cd93	8.159266331	7.879210605
O88338	Cadherin-16	Cdh16	8.637789829	8.734479789
P97326	Cadherin-6	Cdh6	8.005180513	7.932016906
Q8VCP9	C-type lectin domain family 14 member A	Clec14 a	7.833656997	7.613313161
B7ZNH7	Collagen alpha-1(XIV) chain	Col14a 1	7.544564097	7.622524862
E9QPX1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	Col18a 1	8.402089351	8.544192111
Q9JLB4	Cubilin	Cubn	7.774443969	7.921998431
A0A0R4J203	D-amino-acid oxidase	Dao	7.433129518	7.61436984
Q80YC5	Coagulation factor XII	F12	7.505963518	6.953952883
F2Z4A3	Protein Fat1	Fat1	7.483729899	8.220369632
Q501P1	Fibulin-7	Fbln7	7.890085527	7.800442121
Q60928	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	Ggt1	8.365862215	8.276461804
Q9D8I3	Glyoxalase domain-containing protein 5	Glod5	7.053078443	7.42975228
P51655	Glypican-4	Gpc4	8.652343055	8.813247301
P47791	Glutathione reductase, mitochondrial	Gsr	7.612995656	7.443106457
Q3V1J8	Hyaluronan-binding protein 2	Habp2	7.549125927	7.400192489
G5E8M9	Intercellular adhesion molecule 2 (Fragment)	Icam2	7.854791694	8.108903128
Q9DCY0	Glycine N-acyltransferase-like protein Keg1	Keg1	8.114277297	8.07114529
P15947	Kallikrein-1	Klk1	8.138618434	8.093421685
Q61847	Meprip A subunit beta	Mep1b	9.137037455	9.085290578
A0A0J9YVE 6	Protein Mgam	Mgam	7.391288049	7.730297662
Q9QXN5	Inositol oxygenase	Miox	8.775756038	9.011570444
A6H6E2	Multimerin-2	Mmm2	7.676967814	7.668479103
Q8BLF1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	Nceh1	7.813380807	7.98100269
O55125	Protein NipSnap homolog 1	Nipsna p1	8.114610984	8.145817714
P11930	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 19	Nudt19	8.547159121	8.645520515
Q8CIN4	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	Pak2	7.646403726	7.764176132
Q9ESW8	Pyroglutamyl-peptidase 1	Pgpep1	7.818687663	7.737828506
P06869	Urokinase-type plasminogen activator	Plau	6.752278985	6.731991449
P35822	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	Ptprk	8.558588583	8.463892989
O09126	Semaphorin-4D	Sema4 d	8.423409728	8.172310969
Q8C4U3	Secreted frizzled-related protein 1	Sfrp1	8.36398783	8.165244326

E9PYQ9	Solute carrier family 15 member 2	Slc15a2	7.790847904	7.689752696
Q9Z2J0	Solute carrier family 23 member 1	Slc23a1	7.625415352	7.685652184
F6UXY4	Sodium/glucose cotransporter 5 (Fragment)	Slc5a10	7.634074025	7.810501348
O09164	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod3	7.771660959	7.536937023
P56677	Suppressor of tumorigenicity 14 protein homolog	St14	8.07773118	8.117271296
Q924W7	Suppression of tumorigenicity 5 protein	St5	8.879497287	8.836197481
Q9WUR0	Protein Tinag	Tinag	8.272537777	8.329804522
H3BJ97	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Tinag11	7.726319612	7.836577275
Q9ESG4	Collectrin	Tmem27	8.042181595	8.009875634
Q9R0M5	Thiamin pyrophosphokinase 1	Tpk1	7.039414119	7.783188691
Q91X17	Uromodulin	Umod	8.8309093	8.8178297
Q62468	Villin-1	Vil1	8.14113609	8.072617477
Q8R519	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase	Acmsd	0	7.66238002
Q6A078	Centrosomal protein of 290 kDa	Cep290	0	7.277838333
Z4YKM2	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial	Cisd3	0	6.844663528
Q61419	Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	Cmah	0	7.497344381
F6R0N8	Cullin-3 (Fragment)	Cul3	0	7.105169428
Q9D0M3	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	Cyc1	0	7.286007122
A0A0G2JDR2	Endomucin (Fragment)	Emcn	0	7.048441804
Q6KAR6	Exocyst complex component 3	Exoc3	0	8.506505032
Q8R0F8	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	Fahd1	0	7.731910942
Q69ZR9	Protein TASOR	Fam208a	0	7.765743041
F6RG68	F-BAR domain only protein 2	Fcho2	0	7.261500773
Q8K157	Aldose 1-epimerase	Galm	0	7.736476182
O88958	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	Gnpda1	0	7.475961589
P15208	Insulin receptor	Insr	0	7.097604329
A2AFG7	Neural cell adhesion molecule L1	L1cam	0	7.876160085
Q9EP89	Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial	Lactb	0	8.331427297
F8VQ40	Laminin subunit alpha-1	Lama1	0	7.003029471
F6ZL69	Nischarin (Fragment)	Nisch	0	7.397940009
P97333	Neuropilin-1	Nrp1	0	7.45909079
P00796	Renin-2	Ren2	0	7.813580989
P97816	Protein S100-G	S100g	0	7.868585667
O35988	Syndecan-4	Sdc4	0	7.812378511
F7A0H7	Solute carrier family 22 member 12 (Fragment)	Slc22a12	0	6.950754182
Q9R097	Kunitz-type protease inhibitor 1	Spint1	0	7.224014811
Q80YS4	Angiopoietin-1 receptor	Tek	0	7.624178926
Q3UUI3	Acyl-coenzyme A thioesterase THEM4	Them4	0	7.183554534
O88623	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	Usp2	0	7.43055877

Tabela S10: Proteínas exossomais exclusivas do coração.

Accession	Description	GN	Sed Heart (LOG ₁₀ expression)	Exer Heart (LOG ₁₀ expression)
Q6PGK3	Protein 2700097O09Rik	2700097O09Rik	7.467163966	0

G3X9J2	MCG141086	4921513D1 1Rik	7.586812269	0
Q8K4E3	CD226 antigen	Cd226	7.541579244	0
Q8BMS4	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial	Coq3	7.499136995	0
Q8BPM0	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1	Daam1	6.821709997	0
E9Q1L3	Protein Gm15127	Gm15127	7.07114529	0
Q8BLR9	Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor	Hif1an	7.431846046	0
D3Z534	Kalirin	Kalrn	7.596487134	0
E9Q641	Nebulin-related-anchoring protein	Nrap	7.794488047	0
E0CXK9	Protein Pkp2	Pkp2	7.316389751	0
V9GXR9	Small integral membrane protein 5	Ssmim5	7.620031895	0
Q8R2K3	Single-stranded DNA-binding protein	Ssbp1	7.582517884	0
Q6IEE6	Transmembrane protein 132E	Tmem132e	7.359835482	0
E9PZA7	Transformation/transcription domain-associated protein	Ttrap	7.34752516	0
Q3U3Q1	Serine/threonine-protein kinase ULK3	Ulk3	6.933892036	0
F6R860	WD repeat, SAM and U-box domain-containing protein 1 (Fragment)	Wdsub1	7.077367905	0
Q9JLV1	BAG family molecular chaperone regulator 3	Bag3	7.393926007	7.929878524
Q9R229	Bone morphogenetic protein 10	Bmp10	7.946157395	7.943346098
P11404	Fatty acid-binding protein, heart	Fabp3	7.885643872	7.748188027
O70433	Four and a half LIM domains protein 2	Fhl2	8.466274322	8.594944737
O08742	Platelet glycoprotein V	Gp5	7.827627705	7.539577883
Q2TPA8	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	Hsd12	7.39880773	7.629919036
G3UXB0	Interleukin 4, isoform CRA_b	Il4	7.850891184	7.677241846
Q91W17	Integrin-alpha FG-GAP repeat-containing protein 2	Itfg2	7.765966425	7.464489547
A0A0B4J1 F2	Microtubule-associated protein	Map4	7.5774918	7.771366971
Q8R1C6	Methyltransferase-like protein 22	Mettl22	7.197556213	7.344195716
P51667	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	Myl2	7.628695383	8.013258665
Q8BFP9	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial	Pdk1	7.59571662	7.641870545
Q60857	Sodium-dependent serotonin transporter	Slc6a4	7.995415799	7.970346876
P48787	Troponin I, cardiac muscle	Tnni3	8.053846427	8.180125875
K3W4R6	Troponin T, cardiac muscle	Tnnt2	7.629409599	7.895698727
Q8VBT1	Beta-taxilin	Txinb	7.644733927	7.525821952
P52624	Uridine phosphorylase 1	Upp1	7.950948714	7.979184034
J3QMV5	Cytokine receptor-like factor 3	Crlf3	0	6.678882415
O70469	Docking protein 2	Dok2	0	7.377488383
Q7TPD2	Protein FAM185A	Fam185a	0	7.301464073
Q8BLU0	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT2	Flrt2	0	8.013679697
Q3U6B2	G-protein coupled receptor 183	Gpr183	0	7.504742636
B2RXM6	Ly6g6f protein	Ly6g6f	0	7.858897957
Q9D513	Meiosis-specific with OB domain-containing protein	Meiob	0	7.644635504
V9GX81	Protein Mroh6	Mroh6	0	7.53032779
D3YUC9	Methionine-R-sulfoxide reductase B3, mitochondrial	Msrb3	0	7.23325001
Q3UDN6	Myotubularin	Mtm1	0	6.980457892
A0A0A0M QL8	NudC domain-containing protein 3 (Fragment)	Nudcd3	0	7.316808752
Q9DBG5	Perilipin-3	Plin3	0	7.041392685
Q68EF0	Rab-3A-interacting protein	Rab3ip	0	7.303627976
A0A0R4J1 56	Renalase	Rnls	0	7.720324717
E9Q8T1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	Tacc2	0	6.98788961
Q571J5	Zinc finger protein 354C	Znf354c	0	7.951628894

Tabela S11: Proteínas exossomais exclusivas do músculo esquelético.

Accession	Description	GN	Sed Muscle (LOG ₁₀ expression)	Exer Muscle (LOG ₁₀ expression)
E9Q5H2	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E (Fragment)	Anp32e	7.407050815	0
P62932	F-box only protein 40	Fbxo40	7.508933526	0
A2AJ76	Hemicentin-2	Hmcn2	7.712986234	0
Q8K0C1	Importin-13	Ipo13	7.523746467	0
V9GXJ9	Protein KRI1 homolog	Kri1	8.437274797	0
V9GXE5	Spermine oxidase (Fragment)	Smox	7.205204364	0
Q9EP53	Hamartin	Tsc1	8.841734779	0
P56375	Acylphosphatase-2	Acyp2	7.714413592	7.818093869
D3Z6H8	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 2	Amd2	6.928344635	7.075911761
B0F3S4	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats	Bank1	7.208441356	7.386142109
Q64152	Transcription factor BTF3	Btf3	8.481012421	8.400192489
F6RCU2	CAP-Gly domain-containing linker protein 1 (Fragment)	Clip1	9.709609121	7.517063873
P60330	Separin	Esp1	7.514813295	7.716003344
Q9QZ57	Heat shock protein beta-3	Hspb3	7.82672252	7.897352134
Q9D8U0	Interferon-related developmental regulator 2	Ifrd2	7.786254396	7.864154956
Q9ET80	Junctophilin-1	Jph1	7.755264891	7.823409015
Q8CI70	Leucine-rich repeat-containing protein 20	Lrrc20	7.886208624	7.86611004
Q8BLU2	Protein-lysine methyltransferase METTL21C	Mettl21c	7.810837151	7.767823498
O70209	PDZ and LIM domain protein 3	Pdlim3	7.594282029	7.677424438
Q3UV70	[Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 1, mitochondrial	Pdp1	7.623145875	7.595936906
Q9DC22	DDB1- and CUL4-associated factor 6	Dcaf6	0	7.885756881
Q8N7N5	DDB1- and CUL4-associated factor 8	Dcaf8	0	7.571708832
A0A087WRB8	Dystonin (Fragment)	Dst	0	7.632457292
Q99PR8	Heat shock protein beta-2	Hspb2	0	8.07809415
P70227	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	Itpr3	0	7.930949031
Q9ET78	Junctophilin-2	Jph2	0	7.479431337
Q8BWZ3	N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	Naa25	0	7.077367905
F7A4A7	Otogelin-like protein	Otogl	0	8.003460532
Q9Z176	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B" subunit delta	Ppp2r3d	0	7.68645751
Q7M724	Taste receptor type 2 member 106	Tas2r106	0	7.689042339
D3YUN3	Troponin I, slow skeletal muscle	Tnni1	0	7.394801777
J3QSN2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13	Usp13	0	7.50501424

Tabela S12: Proteínas exossomais exclusivas do tecido adiposo marrom.

Accession	Description	GN	Sed BAT (LOG ₁₀ expression)	Exer BAT (LOG ₁₀ expression)
Q91V98	Endosialin	Cd248	6.858296525	0
P43024	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	Cox6a1	7.407390904	0
Q810D6	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	Grwd1	7.322632712	0
A0A0R4J007	Paladin	Pald1	7.342620043	7.827756863
Q3URE1	Acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial	Acsf3	0	7.176958981

P48771	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	Cox7a2	0	7.584670384
Q80TS7	Dendrin	Ddn	0	8.290924559
Q8BUK6	Protein Hook homolog 3	Hook3	0	7.820529849
E9QA63	Microtubule-actin cross-linking factor 1	Macf1	0	8.170555059
Q9DCJ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	Ndufa8	0	7.453165393
P0DN34	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	Ndufb1	0	9.18582536
P52503	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	Ndufs6	0	7.498310554

Tabela S13: Proteínas exossomais exclusivas do tecido adiposo branco.

Accession	Description	GN	Sed WAT (LOG ₁₀ expression)	Exer WAT (LOG ₁₀ expression)
Q8R3W2	MCG6979, isoform CRA_a	0610009B22Rik	7.247727833	0
Q6YI28	EP1	2210407C18Rik	7.839289456	0
Q8BZQ7	Anaphase-promoting complex subunit 2	Anapc2	7.590841835	0
Q8CDJ3	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator	Atg14	7.691081492	0
Q3LFS7	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Ceacam1	7.817036226	0
Q921L5	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 2	Cog2	6.99175754	0
Q91WE4	UPF0729 protein C18orf32 homolog	CR032	7.557146142	0
O70566	Protein diaphanous homolog 2	Diaph2	7.334654767	0
G3X9Z2	MCG129814	Ifitm7	8.196728723	0
Q04999	Inhibin beta B chain	Inhbb	7.539828558	0
Q3UMB9	WASH complex subunit 7	Kiaa1033	7.382737266	0
F8VPR1	Leiomodin-1	Lmod1	6.194514342	0
Q8VC42	Uncharacterized protein C18orf8 homolog	Mic1	6.98376156	0
Q3T9T6	2-5A-dependent ribonuclease	Rnasel	7.007320953	0
Q8R2U0	Nucleoporin SEH1	Seh1l	7.108565024	0
F6UV57	Sarcolemmal membrane-associated protein (Fragment)	Slmap	6.576456532	0
B1AS34	Single-stranded DNA-binding protein 3 (Fragment)	Ssbp3	6.971971276	0
E9QN41	Striatin-interacting proteins 2	Strip2	7.694517454	0
P37804	Transgelin	Tagln	7.721068302	0
Q3UR70	Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1	Tgfbrap1	7.359645793	0
Q9CZM3	Transmembrane protein 33	Tmem33	7.536810866	0
E9PWG2	Protein Trappc8	Trappc8	7.353339095	0
Q3U0M1	Trafficking protein particle complex subunit 9	Trappc9	7.254064453	0
K4DI77	WD repeat-containing protein 81 (Fragment)	Wdr81	7.099680641	0
Q9Z1P8	Angiopoietin-related protein 4	Angptl4	7.648164779	8.072984745
Q8C0J2	Autophagy-related protein 16-1	Atg16l1	7.926239521	7.956312531
E9QL65	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	Cog3	7.145507171	7.20167018
Q9JJA2	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8	Cog8	6.993832867	7.18582536
Q8JZY2	COMM domain-containing protein 10	Comm10	7.771072783	7.814647069
Q9CZG3	COMM domain-containing protein 8	Comm8	7.230704314	7.277838333
Q8CHY3	Dymeclin	Dym	7.862191031	8.046104787
Q6P9Q6	FK506-binding protein 15	Fkbp15	7.726808683	7.640978057

E9Q8I9	Protein furry homolog	Fry	7.822821645	7.696443763
F7BCN0	Protein Gm28048 (Fragment)	Gm28048	7.312600439	7.25358029
Q8C0N2	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Gpat3	7.787743772	7.88349109
P00493	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Hprt1	7.173477643	7.196176185
Q6GV12	3-ketodihydrosphingosine reductase	Kdsr	8.123524981	8.212986185
F8VQ75	Kinesin-like protein	Kif13a	7.102776615	7.611617111
A0A0F6AIX5	Lipid droplet-associated hydrolase	Ldah	7.709524356	7.867703133
Q91VD1	Galectin-12	Lgals12	7.968669702	8.291146762
Q91YX5	Acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	Lpgat1	6.94948759	6.703377369
Q9JI78	Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase	Ngly1	7.314709693	6.941958417
Q9R1J0	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	Nsdhl	7.869173027	7.113943352
Q8K3V4	Protein-arginine deiminase type-6	Padi6	7.757927183	7.544688022
Q9WV95	Pleckstrin homology-like domain family A member 3	Phlda3	7.877428941	7.904011884
Q9CZT4	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	Polr3e	7.112269768	6.874829578
A2AFP4	Ras-related protein Rab-9A (Fragment)	Rab9	7.581152892	7.632254777
F7CGP0	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-2 (Fragment)	Ralgapa2	6.968996327	6.989494313
Q9R1R8	Retinol dehydrogenase 11	Rdh11	7.599446376	7.765817515
Q9Z0F7	Gamma-synuclein	Sncg	7.915927212	7.887673552
Q9R099	Transducin beta-like protein 2	Tbl2	7.895312024	7.917925422
Q62313	Trans-Golgi network integral membrane protein 1	Tgoln1	7.403806611	6.881783956
Q8K2L8	Trafficking protein particle complex subunit 12	Trappc12	7.338057875	7.357363031
F6ZLN8	Vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog (Fragment)	Vps8	6.63124078	7.261500773
E0CZ28	Protein 1700112E06Rik	1700112E06Rik	0	7.497758718
B1AQG3	Protein 5730455P16Rik (Fragment)	5730455P16Rik	0	7.416474079
A2AIG8	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-like protein 1	Accs	0	7.726890141
A0A0G2JF12	Anaphase-promoting complex subunit 5	Anape5	0	7.063333359
Q3UMR0	Ankyrin repeat domain-containing protein 27	Ankrd27	0	7.18582536
A0A0G2JFH9	AP-5 complex subunit zeta-1	Ap5z1	0	7.150449409
Q9D7N9	Adipocyte plasma membrane-associated protein =Mus musculus GN=Apmmap PE=1 SV=1 - [APMAP_MOUSE]	Apmmap	0	7.689841409
Q9CQY1	Ubiquitin-like protein ATG12	Atg12	0	7.416474079
P29452	Caspase-1	Casp1	0	7.272305844
Q8C1Y8	Vacuolar fusion protein CCZ1 homolog	Ccz1	0	7.904336792
E9QLX1	Antigen-presenting glycoprotein CD1d2	Cd1d2	0	7.653598382
D6RCW3	Cholinephosphotransferase 1	Chpt1	0	7.229169703
Q8C0L8	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 5	Cog5	0	7.753353213
Q3TR20	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7	Cog7	0	6.932118472
B7ZNP3	COMM domain-containing protein 6	Commmd6	0	7.961610908
H3BLR7	Atrial natriuretic peptide-converting enzyme (Fragment)	Corin	0	7.684845362
Q922R1	UPF0183 protein C16orf70 homolog	CP070	0	7.642563437
Z4YKT6	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	Dhrs7b	0	7.550105999
Q8K3B1	F-box/SPRY domain-containing protein 1	Fbxo45	0	7.782400952
P59266	Fat storage-inducing transmembrane protein 2	Fitm2	0	6.787602146
Q6A099	MKIAA0248 protein (Fragment)	Gbf1	0	6.515078675
F6Q7C7	Hermansky-Pudlak syndrome 5 protein homolog (Fragment)	Hps5	0	6.562292864
G3X9T4	Protein MGARP	Mgarp	0	6.752586179
Q9CQ20	Mid1-interacting protein 1	Mid1ip1	0	8.183554534
Q6P572	Mtmr2 protein	Mtmr2	0	6.404149249

O88441	Metaxin-2	Mtx2	0	7.870813424
Q8BH82	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D	Napepld	0	7.156851901
Q3UBG2	PTB-containing, cubilin and LRP1-interacting protein	Pidl	0	7.48756256
Q9DBX5	Phospholipase A2	Pla2g4a	0	7.023663918
Q7TQ62	Podocan	Podn	0	7.507990725
Q9D6X6	Serine protease 23	Prss23	0	7.773274348
Q99P87	Resistin	Retn	0	7.671635597
Q8BU14	Translocation protein SEC62	Sec62	0	6.766710207
A0A0G2JED4	SH2B adapter protein 2	Sh2b2	0	6.837840862
P46062	Signal-induced proliferation-associated protein 1	Sipa1	0	6.416307587
E9QNA7	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	Sorbs1	0	7.409256652
Q8R5A6	TBC1 domain family member 22A	Tbc1d22a	0	7.084933575
B1ATR2	Testis-expressed sequence 2 protein	Tex2	0	6.968342831
Q3U1V6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3	Uevld	0	7.707144188

6 REFERÊNCIAS

AGUDELO, Leandro Z. et al. Skeletal Muscle PGC-1 α Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression. **Cell**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 33–45, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.051.

CASTAÑO, Carlos; MIRASIERRA, Mercedes; VALLEJO, Mario; NOVIALS, Anna; PÁRRIZAS, Marcelina. Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FoxO1 in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], p. 202016112, 2020. DOI: 10.1073/pnas.2016112117. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.2016112117>.

CHAAR, Vicky; ROMANA, Marc; TRIPETTE, Julien; BROQUERE, Cédric; HUISSE, Marie Geneviève; HUE, Olivier; HARDY-DESSOURCES, Marie Dominique; CONNES, Philippe. Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 15–25, 2011. DOI: 10.3233/CH-2010-1361.

COSTA-SILVA, Bruno et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 816–826, 2015. DOI: 10.1038/ncb3169.

DE OLIVEIRA, Getúlio P.; PORTO, William F.; PALU, Cintia C.; PEREIRA, Lydyane M.; REIS, Alessandra M. M.; MARÇOLA, Tatiana G.; TEIXEIRA-NETO, Antonio R.; FRANCO, Octavio L.; PEREIRA, Rinaldo W. Effects of endurance racing on horse plasma extracellular particle miRNA. **Equine Veterinary Journal**, [S. l.], n. December 2019, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1111/evj.13300.

FERREIRA, Julio C. B.; ROLIM, Natale P. L.; BARTHOLOMEU, Jan B.; GOBATO, Claudio A.; KOKUBUN, Eduardo; BRUM, Patricia C. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.

FRÜHBEIS, Carsten; HELMIG, Susanne; TUG, Suzan; SIMON, Perikles; KRÄMER-ALBERS, Eva Maria. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.28239.

HOSHINO, Ayuko et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, [S. l.], v. 527, n. 7578, p. 329–335, 2015. DOI: 10.1038/nature15756. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature15756><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26524530>.

HOU, Zuoxu et al. Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection. **Circulation research**, [S. l.], v. 124, n. 9, p. 1386–1400, 2019. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314635.

OLIVEIRA, Getúlio P. et al. Effects of acute aerobic exercise on rats serum extracellular vesicles diameter, concentration and small RNAs content. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00532.

PEDERSEN, Bente K. Muscle as a secretory organ. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 1337–1362, 2013. DOI: 10.1002/cphy.c120033.

PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Med.**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 883–891, 2012.

QU, Le et al. Exosome-Transmitted IncARS Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 653–668, 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.004.

RAO, Rajesh R. et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. **Cell**, [S. l.], v. 157, n. 6, p. 1279–1291, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.065. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.065>.

ROBERTS, Lee D. et al. β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 96–108, 2014. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.12.003.

RUAS, Jorge L. et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. **Cell**, [S. l.], v. 151, n. 6, p. 1319–1331, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.050. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.050>.

SAFDAR, Adeel; SALEEM, Ayesha; TARNOPOLSKY, Mark A. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 504–517, 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2016.76. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.76>.

SAFDAR, Adeel; TARNOPOLSKY, Mark A. Exosomes as Mediators of the Systemic Adaptations to Endurance Exercise. **Cold spring harbor**, [S. l.], v. 8, n. a029827, p. 1–23, 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a029827.

SHAH, Ravi et al. Small RNA-seq during acute maximal exercise reveal RNAs involved in vascular inflammation and cardiometabolic health: Brief report. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 313, n. 6, p. H1162–H1167, 2017. DOI: 10.1152/ajpheart.00500.2017.

SUBRAMANIAN, Aravind; TAMAYO, Pablo; MOOTHA, Vamsi. GSEA : Gene set enrichment analysis Gene set enrichment analysis : A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2014.

THÉRY, Clotilde; AMIGORENA, Sebastian; RAPOSO, Graça; CLAYTON, Aled. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 3.22.1-3.22.29, 2006. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

WHITHAM, Martin et al. Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 237- 251.e4, 2018. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.12.001.

ANEXOS

1 Aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte

**ESCOLA DE
EDUCAÇÃO FÍSICA
E ESPORTE**
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

São Paulo, 08 de março de 2018.

CERTIFICAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "*Papel dos microRNAs na atenuação do crescimento tumoral do câncer de cólon induzida pela atividade física aeróbia em camundongos*", registrada com o nº 2018/02 sob a responsabilidade da Professora Doutora Edilamar Menezes de Oliveira e do aluno Gabriel Tobias - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) EEFE-USP, em reunião de 08/03/2018.

Finalidade () Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização: 01/04/2018 a 13/12/2021
Espécie/linhagem/raça: Camundongos Balb/c Fêmeas
Nº de animais: 70
Peso/Idade: 20-25 gr.
Sexo: Feminino
Origem: Biotério Central da USP

Reiteramos a importância de apresentar Relatório Parcial na metade do projeto (fev/2018) e Relatório Final ao término da vigência do projeto (dez/2021). Lembramos ainda que qualquer alteração no projeto inicial deve ser comunicada à CEUA, incluindo alteração no número de animais utilizados, bem como a origem dos referidos animais.

Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires
Coordenador da CEUA
EEFE-USP

À Profª Drª Edilamar Menezes de Oliveira
Docente EEFE-USP

Av. Professor Mello Moraes, 65
CEP 05508-900 | São Paulo - SP | Brasil
55 11 3091-3077 | www.eefe.usp.br

Please cite this article in press as: Bojmar et al., Extracellular vesicle and particle isolation from human and murine cell lines, tissues, and bodily fluids, STAR Protocols (2020), <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100225>

STAR Protocols

CellPress
OPEN ACCESS

Protocol

Extracellular vesicle and particle isolation from human and murine cell lines, tissues, and bodily fluids

Linda Bojmar,^{1,2,15,16} Han Sang Kim,^{1,3,15} Gabriel C. Tobias,^{1,4} Fanny A. Pelissier Vatter,¹ Serena Lucotti,¹ Kofi Ennu Gyan,^{1,5} Candia M. Kenific,¹ Zurong Wan,^{1,6} Kyung-A Kim,³ DooA Kim,³ Jonathan Hernandez,^{7,8} Virginia Pascual,^{6,9} Todd E. Heaton,^{10,11} Michael P. La Quaglia,^{10,11} David Kelsen,¹² Tanya M. Trippett,¹⁰ David R. Jones,¹³ William R. Jarnagin,⁷ Irina R. Matei,¹ Haiying Zhang,^{1,*} Ayuko Hoshino,^{1,14,15,*} and David Lyden^{1,17,*}

¹Children's Cancer and Blood Foundation Laboratories, Departments of Pediatrics, and Cell and Developmental Biology, Drukier Institute for Children's Health, Meyer Cancer Center, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA

²Department of Biomedical and Clinical Sciences, Linköping University, Linköping 58183, Sweden

³Yonsei Cancer Center, Division of Medical Oncology, Department of Internal Medicine, Graduate School of Medical Science, Brain Korea 21 Project, Severance Biomedical Science Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

⁴School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁵Tri-Institutional PhD Program in Computational Biology and Medicine, New York, NY, USA

⁶Department of Pediatrics, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA

⁷Hepatopancreatobiliary Service, Department of Surgery, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

⁸Surgical Oncology Program, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

⁹Drukier Institute for Children's Health, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA

¹⁰Department of Pediatrics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

¹¹Pediatric Surgical Service, Department of Surgery, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

¹²Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

¹³Thoracic Surgery Service, Department of Surgery, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

¹⁴School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan

¹⁵These authors contributed equally

¹⁶Technical Contact

¹⁷Lead Contact

*Correspondence: haz2005@med.cornell.edu (H.Z.), ayukohoshino@bio.titech.ac.jp (A.H.), dcl2001@med.cornell.edu (D.L.) <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100225>

SUMMARY

We developed a modified protocol, based on differential ultracentrifugation (dUC), to isolate extracellular vesicles and particles (specifically exomeres) (EVPs) from various human and murine sources, including cell lines, surgically resected tumors and adjacent tissues, and bodily fluids, such as blood, lymphatic fluid, and bile. The diversity of these samples requires robust and highly reproducible protocols and refined isolation technology, such as asymmetric-flow field-flow fractionation (AF4). Our isolation protocol allows for preparation of EVPs for various downstream applications, including proteomic profiling. For complete details on the use and execution of this protocol, please refer to Hoshino et al. (2020).

Exercise training reverses cancer-induced oxidative stress and decrease in muscle COPS2/TRIP15/ALIEN

Christiano R.R. Alves^{1,2,3,*}, Willian das Neves^{1,4}, Ney R. de Almeida¹, Eric J. Eichelberger³, Paulo R. Jannig^{1,5}, Vanessa A. Voltarelli¹, Gabriel C. Tobias¹, Luiz R.G. Bechara¹, Daniele de Paula Faria⁶, Maria J.N. Alves⁷, Lars Hagen^{8,9}, Animesh Sharma^{8,9}, Geir Slupphaug^{8,9}, José B.N. Moreira¹⁰, Ulrik Wisloff¹⁰, Michael F. Hirshman², Carlos E. Negrão^{1,7}, Gilberto de Castro Jr.⁴, Roger Chammas⁶, Kathryn J. Swoboda³, Jorge L. Ruas⁵, Laurie J. Goodyear², Patricia C. Brum^{1,***}

ABSTRACT

Objective: We tested the hypothesis that exercise training would attenuate metabolic impairment in a model of severe cancer cachexia.

Methods: We used multiple in vivo and in vitro methods to explore the mechanisms underlying the beneficial effects induced by exercise training in tumor-bearing rats.

Results: Exercise training improved running capacity, prolonged lifespan, reduced oxidative stress, and normalized muscle mass and contractile function in tumor-bearing rats. An unbiased proteomic screening revealed COP9 signalosome complex subunit 2 (COPS2) as one of the most downregulated proteins in skeletal muscle at the early stage of cancer cachexia. Exercise training normalized muscle COPS2 protein expression in tumor-bearing rats and mice. Lung cancer patients with low endurance capacity had low muscle COPS2 protein expression as compared to age-matched control subjects. To test whether decrease in COPS2 protein levels could aggravate or be an intrinsic compensatory mechanism to protect myotubes from cancer effects, we performed experiments in vitro using primary myotubes. COPS2 knockdown in human myotubes affected multiple cellular pathways, including regulation of actin cytoskeleton. Incubation of cancer-conditioned media in mouse myotubes decreased F-actin expression, which was partially restored by COPS2 knockdown. Direct repeat 4 (DR4) response elements have been shown to positively regulate gene expression. COPS2 overexpression decreased the DR4 activity in mouse myoblasts, and COPS2 knockdown inhibited the effects of cancer-conditioned media on DR4 activity.

Conclusions: These studies demonstrated that exercise training may be an important adjuvant therapy to counteract cancer cachexia and uncovered novel mechanisms involving COPS2 to regulate myotube homeostasis in cancer cachexia.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Exercise training delays cardiac remodeling in a mouse model of cancer cachexia

L.G. Fernandes^{a,b}, G.C. Tobias^b, A.O. Paixão^b, P.M. Dourado^c, V.A. Voltarelli^b, P.C. Brum^{b,*}

^a Department of Experimental Pathophysiology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^b School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^c Heart Institute, Clinical Hospital, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aerobic exercise training
Cancer cachexia
Cardiac damage
Fibrosis
Inflammation
Necrosis

ABSTRACT

Aims: We aimed to investigate the impact of cancer cachexia and previous aerobic exercise training (AET) on cardiac function and structure in tumor bearing mice.

Main methods: Colon adenocarcinoma cells 26 (CT26) were subcutaneously injected in BALB/c mice to establish robust cancer cachexia model. AET was performed on a treadmill during 45 days, 60 min/5 days per week. Cardiac function was evaluated by echocardiography and cardiac morphology was assessed by light microscopy. The protein expression levels of mitochondrial complex were analyzed by Western blotting. The mRNA levels of genes related to cardiac remodeling and autophagy were analyzed by quantitative Real-Time PCR.

Key findings: Our data confirms CT26 tumor bearing mice as a well-characterized and robust model of cancer cachexia. CT26 mice exhibited cardiac remodeling and dysfunction characterized by cardiac atrophy and impaired left ventricle ejection fraction paralleled by cardiac necrosis, inflammation and fibrosis. AET partially reversed the left ventricle ejection fraction and led to significant anti-cardiac remodeling effect associated reduced necrosis, inflammation and cardiac collagen deposition in CT26 mice. Reduced *TGF-β1* mRNA levels, increased mitochondrial complex IV protein levels and partial recovery of *BNIP3* mRNA levels in cardiac tissue were associated with the cardiac effects of AET in CT26 mice. Thus, we suggest AET as a powerful regulator of key pathways involved in cardiac tissue homeostasis in cancer cachexia.

Significance: Our study provides a robust model of cancer cachexia, as well as highlights the potential and integrative effects of AET as a preventive strategy for reducing cardiac damage in cancer cachexia.

JOURNAL CLUB

Exercise training and tumour progression: Younger, harder, better, faster and strongerGabriel Cardial Tobias¹ ,João Lucas P. Gomes¹ ,

and Vanessa Azevedo Voltarelli

*School of Physical Education and Sport,
University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*

Email: gabriel.tobias@usp.br

Edited by: Michael Hogan & Karyn Hamilton

Linked articles: This Journal Club article highlights an article by Moreira *et al.* To read this article, visit <https://doi.org/10.1113/JP277645>.

In recent years, the literature has demonstrated the benefits of aerobic physical activity with respect to reducing the incidence of several cancer types. In an elegant study, Moore *et al.* (2016) reported that leisure-time physical activity reduced the incidence of 13 types of cancer (oesophageal adenocarcinoma, myeloid leukaemia, and myeloma, liver, lung, kidney, gastric, endometrial, colon, rectal, head and neck, bladder and breast cancers) among 26 types that were analysed in a 1.44 million adults cohort. Moreover, it was observed that the effect of physical activity on cancer incidence reduction was directly proportional to the physical activity daily volume performed by the individuals. Also, the effects of physical activity on the reduction of cancer incidence were independent of other factors, such as body mass index, smoking, geographical region, use of hormonal therapy and ethnicity (Moore *et al.* 2016).

Accordingly, clinical findings indicate that cancer patients with reduced daily physical capacity present a worse prognosis (Lakoski *et al.* 2015). Indeed, Lakoski *et al.* (2015) demonstrated that lung and colon cancer patients with greater aerobic physical capacity present a higher survival rate compared to cancer patients with lower aerobic physical capacity (Lakoski *et al.* 2015).

Studies also demonstrate that aerobic physical activity is capable of attenuating tumour growth in different animal models of cancer (Betof *et al.* 2015; Pedersen *et al.* 2016). However, the molecular mechanisms

involved in these responses are still poorly understood. Recently, Pedersen *et al.* (2016) demonstrated that 4 weeks of voluntary wheel running, as performed before tumour cell inoculation, delayed tumour initiation, attenuated tumour growth and decreased the metastatic nodule formation in several mice cancer models (Pedersen *et al.* 2016). It was demonstrated that physical activity increased the mobilization and redistribution of natural killer cells to the tumour microenvironment in an interleukin-6 and epinephrine-dependent manner. In convergence, Betof *et al.* (2015) demonstrated that 18 days of voluntary wheel running during tumour progression was capable of attenuating tumour growth in a 4T1 breast cancer model by increasing pericyte coverage of tumour vessels, at the same time as inducing tumour cell apoptosis.

Recently, Moreira *et al.* (2019) published a study in the *Journal of Physiology* showing that 60 days of moderate-intensity aerobic treadmill exercise training, initiated in 30- and 70-day-old male rats and completed prior to inoculation with Walker 256 breast cancer cells, significantly reduced tumour growth compared to sedentary controls. Interestingly, rats starting the exercise training at 30 days old presented a more pronounced reduction in tumour growth compared to rats that started the exercise training protocol at 70 days old, suggesting that starting exercise training in early life improves the host response against tumour progression. Nevertheless, exercise training equally decreased Walker 256 cell proliferation as analysed by proliferating cell nuclear antigen in rats at both ages (Moreira *et al.* 2019).

In the same study, Moreira *et al.* (2019) also investigated the role of moderate intensity aerobic exercise training on Walker 256 tumour-induced cachexia. Cancer cachexia is defined as a multifactorial syndrome characterized by a continuous loss of body mass, mainly as a result of adipose tissue and skeletal muscle loss, which cannot be completely reversed by conventional nutritional support, leaving patients with progressive functional disability. Currently, cancer cachexia is responsible for more than 25% of the deaths caused by cancer, and its treatment remains as a major challenge. The absence of an effective treatment is

mainly the result of an unattractive scenario of pharmacological monotherapies because the mechanisms involved in this syndrome are complex, multifactorial and poorly understood (Fearon *et al.* 2013).

Moreira *et al.* (2019) showed that aerobic exercise training, performed in a moderate intensity, prevented cancer cachexia-induced body mass and gastrocnemius muscle mass loss in rats starting an exercise training protocol at 30 days old. It is important to highlight that Walker 256 tumours did not induce adipose tissue loss, reinforcing the idea that exercise training could prevent body weight loss by protecting other tissues and organs, such as skeletal muscle and the heart. Indeed, cachexia-inducing tumours could induce splenomegaly, metastasis and anorexia, and could increase liver and lung mass, whereas exercise training appears to prevent/attenuate these tumour-induced effects. Thus, additional studies will be necessary to better understand whether the beneficial effects of aerobic exercise training are restricted to a tumour microenvironment, or whether such training can also play a role in other organs and tissues, protecting the whole body against tumour-induced deleterious effects.

Although there are several reports showing that exercise training can attenuate cancer cachexia, the molecular mechanisms involved in this outcome remain to be better elucidated. During cancer cachexia progression, the balance between protein synthesis and degradation in skeletal muscle is disrupted, exacerbating protein degradation and apoptosis signalling pathways, as triggered by increased protein expression of atrogen, MURF, FOXO and myostatin. In addition, decreased protein synthesis is also observed, usually accompanied by a decrease in protein expression of insulin-like growth factor and phosphoinositide 3-kinase. At the same time, cachectic patients develop anorexia, which in turn potentiates the loss of skeletal muscle and body mass, leading to a vicious cycle, where energy imbalance is the main phenomenon. Furthermore, there is a remarkable increase in PAX7 expression in cachectic muscles, which induces the proliferation of satellite cells in an abnormal way, impairing their differentiation process,

High-intensity interval training slows down tumor progression in mice bearing Lewis lung carcinoma

Christiano R. R. Alves^{1*}, Willian das Neves¹, Gabriel C. Tobias¹, Ney R. de Almeida¹, Raphael F. Barreto¹, Camila M. Melo², Camila de G. Carneiro², Alexandre T. Garcez², Daniele de P. Faria², Roger Chammas², Patricia C. Brum^{1*}

¹ School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ² Dept. of Radiology and Oncology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

Background We aimed to determine whether a short-term high-intensity interval training (HIIT) protocol could counteract tumor progression in an experimental model of lung cancer.

Methods Mice were injected subcutaneously with Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells and then randomly assigned into two groups: sedentary mice (LLC group) or mice submitted to HIIT (LLC + HIIT group).

Results LLC + HIIT group had lower tumor mass than LLC group (-52% after 18 days), with no differences in glycolytic activity as measured by PET/CT imaging. HIIT increased Cd274 (PD-L1) mRNA expression by ~6 folds and Vegfa mRNA expression by 2.5 folds, suggesting that HIIT stimulates local inflammation and angiogenesis in LLC tumors. Additionally, HIIT improved running capacity, skeletal muscle contractility and survival rate in LLC tumor-bearing mice.

Conclusions These novel findings demonstrate that a short-term HIIT protocol slows down tumor progression, ultimately increasing survival in LLC tumor-bearing mice. Thus, this study provides novel pre-clinical evidence that exercise training may be a beneficial co-therapy for lung cancer.

Address for correspondence: Patricia C. Brum and Christiano R. R. Alves, Avenue Prof. Mello Moraes, 65 - Butantã, 05508-030, Sao Paulo, SP, Brazil. Tel: +55 11 3091-2149; Fax: +55 11 3813-5921; E-mail: pcbrum@usp.br and christiano.alves@joslin.harvard.edu

Keywords: Cancer cachexia; Lung cancer; Aerobic exercise training; LLC tumor cells.

Received 20 January 2018 **Accepted** 04 July 2018

Introduction

Endurance capacity predicts early mortality and the enrollment in regular physical activity reduces the incidence of several diseases [1, 2]. Exercise training induces pleiotropic effects in the body, regulating the rate of energy production, blood flow, and substrate utilization [3]. Over the past decades, aerobic exercise training has been applied not only as a preventive strategy, but also as a non-pharmacological therapy or co-adjuvant treatment for cardiovascular, metabolic/endocrine, rheumatic and neurological diseases [4–9]. In the oncology field, more than 200 original studies have now analyzed the role of aerobic exercise training (or at least regular physical activity) in cancer patients [10]. Comprehensive reviews of those studies have proposed that a structured exercise training protocol is a safe and effective co-therapy for most of

cancer patients during and after the first-line treatment [10].

Due to the advances in cancer treatment, cancer-specific survival rates for the 10 most common malignancies improved dramatically in the last three decades and patients diagnosed with those malignancies now have sufficient longevity, except for lung cancer cases [10, 11]. Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide [12]. Most of lung cancer patients receive chemotherapy with or without radiation. Targeted drugs, such as inhibitors for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase are also important for treatment of non-small cell lung cancer patients [11]. Despite pharmacological advances, adjuvant therapy and palliative supportive care for lung cancer patients is still limited. There is a paucity of well-designed studies to support the efficacy and safety of exercise training for lung cancer patients. The lack of studies can be partially explained by the frailty and

Chapter

A Landscape of Epigenetic Regulation by MicroRNAs to the Hallmarks of Cancer and Cachexia: Implications of Physical Activity to Tumor Regression

*Gabriel Cardial Tobias, João Lucas Penteado Gomes,
Ursula Paula Renó Soci, Tiago Fernandes
and Edilamar Menezes de Oliveira*

Abstract

In the last decades, there has been a remarkable advance in the treatment of most types of cancer, improving the patient's prognosis. During cancer progression, tumor cells develop several biological changes to support initiation, proliferation, and resistance to death. Nearly 50–80% of all oncologic patients experience rapid weight loss that is related to ~20% of cancer-related deaths. Cancer cachexia is a syndrome characterized by loss of skeletal muscle mass, anorexia, and anemia. A lot of effort in scientific investigation has contributed to the understanding of cancer processes, in which epigenetic changes, as microRNAs, can influence cancer progression. Therefore, useful strategies to control the cancer-induced epigenetic changes in the tumor cells can have a key role in a clinical perspective to decrease the cancer development and aggressiveness. Physical activity has been proposed as a suitable tool to manage tumor growth and cachexia and to improve the deleterious sequelae experienced during cancer treatment. Although the molecular mechanisms involved in these responses are poorly understood, this chapter aims to discuss the role of microRNAs in the cancer-induced epigenetic changes and how physical activity could influence the epigenetic control of tumor cells and cachexia and their potential role in clinical applications for cancer.

Keywords: epigenetic, cancer, hallmarks of cancer, cachexia, physical activity, tumor progression, microRNAs

MicroRNA e exercício físico: importantes reguladores do remodelamento cardíaco e do músculo esquelético

João Lucas Penteado Gomes

Gabriel Cardial Tobias

Edilamar Menezes de Oliveira

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas os microRNA estão sendo amplamente estudados por seu papel na regulação de muitos processos celulares. São pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA), com tamanho entre 17 e 25 nucleotídeos, que não codificam proteína e têm como principal função a regulação pós-transcricional em plantas, animais e seres humanos.¹

A literatura aponta que aproximadamente um terço de todos os genes que codificam proteínas são regulados por microRNA. Os microRNA se ligam à região 3'UTR (região não traduzida) de RNA-mensageiros (RNAm) e impedem a tradução deste gene em uma proteína. Dessa forma, o aumento da expressão de determinado microRNA acarreta a redução da tradução de seus mRNA-alvo e, consequentemente, diminui a expressão proteica. Por outro lado, o inverso também é verdadeiro, ou seja, a inibição de determinado microRNA gera o aumento da tradução do mRNA-alvo em proteína.^{1,2}

A ligação dos microRNA com o mRNA-alvo pode ser com parcial ou total complementariedade, processos que indicam se o mRNA será degradado ou se a tradução será apenas inibida.³ A complementariedade total se dá com o pareamento perfeito do microRNA com o alvo, levando à degradação dos mRNA, fenômeno este que é mais comumente observado em plantas. Todavia, a complementariedade parcial é o processo no qual apenas alguns dos pares de base são complementares, promovendo a inibição da tradução do alvo. A possibilidade desse pareamento imperfeito junta-