

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE
DEPARTAMENTO DE BIODINÂMICA DO MOVIMENTO DO CORPO HUMANO

JOÃO LUCAS PENTEADO GOMES

PAPEL DO MICRORNA-33A E DA PROTEÍNA SIRTUINA 6 NO METABOLISMO E
PROGRESSÃO DO CÂNCER DE CÓLON EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

São Paulo, 2022

JOÃO LUCAS PENTEADO GOMES

Projeto de Doutorado à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito para o exame de qualificação.

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e do Esporte.

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício

São Paulo, 2022

Ficha Catalográfica

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Gomes, João Lucas Penteado
PAPEL DO MICRORNA-33A E DA PROTEÍNA SIRTUINA 6 NO METABOLISMO E
PROGRESSÃO DO CÂNCER DE CÓLON EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO/ João Lucas Penteado Gomes – São Paulo: [s.n],
2022. 94 pg.
Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Prof(a) Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

1. Câncer 2. Metabolismo energético 3. Exercício Físico 4. Reprogramação metabólica

Folha de avaliação

GOMES, João Lucas Penteadó

PAPEL DO MICRORNA-33A E DA PROTEÍNA SIRTUINA 6 NO METABOLISMO E PROGRESSÃO DO CÂNCER DE CÓLON EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

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

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano

Orientadora: Prof^a Dr^a Edilamar Menezes de Oliveira

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Agradecimentos

Duas mulheres são fundamentais na minha vida, uma delas me lembra da importância do meu passado e a outra me inspira a querer sempre um futuro melhor. A primeira é minha mãe, ela me ensinou a importância de persistir, de estudar, de buscar aperfeiçoamento diário. A Dona Neusa para mim é um exemplo de humildade e garra, tenho com ela as melhores recordações da minha infância e a ela devo as possibilidades de estudar em bons lugares e chegar até aqui. A segunda é minha esposa; ela é o meu maior suporte, com ela que compartilho meus sonhos e também a ela devo minhas conquistas; com a Carol eu aprendi sobre companheirismos e amizade. Por isso o meu primeiro e mais importante agradecimento eu devo a elas.

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanharam nessa jornada. Aos companheiros de laboratório Camila, Vanessa, Noemy, Ney, Úrsula, Marcelo, Janaina, Felipe e Bruno, por todas as discussões científicas que me inspiraram e auxiliaram na construção desse trabalho, e também por todos os momentos divertidos ou filosóficos na hora do café e nos momentos descontraídos. Desses amigos cabe um agradecimento especial ao Gabriel por me ajudar na construção desse trabalho, de modo que sem ele esse trabalho não seria viável; além do fato que ele é um exemplo de paixão pelo faz, de dedicação e de parceria.

Também se faz necessário agradecer aos amigos que não participaram diariamente da construção desse trabalho, muitos deles pouco entendem o que esse trabalho significa, mas eles entendem o significado desse trabalho para mim e sabem este é o resultado de uma conquista; sei que isso é o bastante para eles se felicitarem. Dessa forma, aqui fica meu agradecimento ao André Luiz, André Casanova, Luciana, Arthur Stabile, Arthur Rodrigues e Henrique.

Por último, mas não menos importante, agradeço profundamente a Professora Edilamar Menezes de Oliveira pela orientação, comprometimento, mentoria e parceria em quase uma década da minha vida acadêmica e além. Aos professores que comandam os Laboratórios de Bioquímica e de Fisiologia do Exercício Patrícia Brum, Paulo Ramires e Tiago Fernandes (meu amigo e mentor) pelo suporte e inspiração. Agradeço a todos os funcionários da EEFUEUSP, principalmente aos funcionários do setor de pós-graduação por todo o suporte prestado. Também agradeço ao apoio financeiro da FAPESP e da CAPES-PROEX por subsidiarem esse trabalho.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos números 2017/22069-3 e 2015/22814-5. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX).

Dedicado ao meu filho Valentim, meu amor.

“Estava mais angustiado que um goleiro na hora do gol.
Quando você entrou em mim como um sol no quintal [...].”

Antônio Carlos Belchior

“[...] O homem livre se envolve com livros [...]”

Djonga

Gomes, JLP. **Papel do microRNA-33a e da Proteína Sirtuina 6 no Metabolismo e Progressão do Câncer de Cólon em Camundongos Submetidos ao Treinamento Físico Aeróbico**. 2022, tese de Doutorado – Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Na década 20 do século XX Otto Warburg descreveu que o metabolismo de tumores se comportava de maneira anômala comparado com outros tecidos, em 2011 Hanahan e Weinberg descreveram que reprogramação metabólica é uma característica comum em muitos tumores, esse processo está relacionado com alterações na expressão de genes e proteínas que orquestram o metabolismo celular. Dessa forma, a quase cem anos se estuda o metabolismo tumoral e suas implicações na progressão tumoral. Evidências acumuladas sugerem que alterações no metabolismo de tumores sustentam a alta demanda energética gerada pela proliferação e crescimento de células cancerosas. Nesse sentido, esse trabalho se debruçou em estudar a influência do treinamento físico aeróbico (TFA) nas alterações no metabolismo de células de tumores de cólon (CT26) e no crescimento tumoral. A hipótese original desse trabalho era que o eixo microRNA-33a / Sirtuina 6 (SIRT6), genes reguladores do metabolismo glicolítico, controlariam o crescimento tumoral e por sua vez o TFA controlaria esses genes no sentido de diminuir a expressão do micrRNA-33a e aumentar SIRT6, conseqüentemente desacelerando o crescimento tumoral. A hipótese inicial foi refutada, por outro lado as investigações mostraram que o TFA leva ao crescimento mais lento dos tumores no grupo treinado (TR8+CT26) comparado com o grupo sedentário (SED+CT26), houve diminuição da expressão dos genes relacionados com a reprogramação metabólica e a via glicolítica, por exemplo HIF1 α (p=0,01), GLUT1 (p=0,07), PDK1 (p=0,05), LDHa (p=0,03). Ainda, foi demonstrado diminuição da expressão de genes que codificam enzimas que compõe o ciclo do ácido cítrico em decorrência do TFA, tais como, IDH2 (p=0,02) e há tendência de diminuição da expressão do gene SDHa (p=0,053). Também foi observada menor expressão proteica de HIF1 α (p=0,04) e menor produção de lactato (p=0,004) nos tumores de animais treinados. Também foi demonstrado que células primárias obtidas dos tumores do grupo TR8+CT26 apresentam menores taxas de respiração celular e acidificação do meio celular comparado com o grupo SED+CT26. Ainda, foram feitas análises de microRNA-*array*. Ao final da análise 6 microRNAs foram selecionados para validação por PCR e dentre esses se destacou o microRNA-16-2-3p. Este microRNA apresentou expressão diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo sedentário (p=0,03) assim como observado nas análises de varredura. Conclui-se do trabalho que o TFA altera o metabolismo tumoral contribuindo para o menor crescimento dos tumores. **Palavras chave:** Câncer de cólon; Glicólise; proliferação e crescimento tumoral; exercício físico.

Abstract

Gomes, JLP. **The role of microRNA-33a and Sirtuin 6 in colon cancer metabolism and tumor progression in aerobic trained mice.** 2022, PhD thesis – School of Physical Education and Sport of the University of São Paulo.

In the past century beginning Otto Warburg described an anomalous metabolism behavior of tumors compared to other tissues. Hanahan and Weinberg in 2011 described that metabolic reprogramming is a common feature in many tumors, this process is related to changes in the expression of genes and proteins that orchestrate cellular metabolism. Therefore, for almost one hundred years tumor metabolism and its implications for tumor progression have been studied. Metabolic reprogramming in cancer cells supports the high energy demand generated by the proliferation and growth. In this sense, the present study focused on clarifying the influence of aerobic exercise training (AET) on changes in colon tumor cell metabolism (CT26) and tumor growth. The original hypothesis of this study was that the microRNA-33a / Sirtuin 6 (SIRT6) axis would control tumor growth. In turn, AET would control these genes in the sense of decreasing the expression of microRNA-33a and increasing SIRT6, consequently slowing tumor growth. The initial hypothesis was refuted, on the other hand, the investigations showed that AET leads to slower growth of tumors in the trained group (TR8+CT26) compared to the sedentary group (SED+CT26). There was a decrease in the expression of genes related to the metabolic reprogramming and the glycolytic pathway, for example HIF1 α (p=0.01), GLUT1 (p=0.07), PDK1 (p=0.05), LDHa (p=0.03). Furthermore, we showed a decrease in the expression of citric-acid-enzymes genes as a result of TFA, such as IDH2 (p=0.02), and there is a tendency to decrease the expression of the SDHa gene (p=0.053). Decreased protein expression of HIF1 α (p=0.04) and lower lactate production (p=0.004) were also observed in tumors from trained animals. It was also demonstrated that primary cells obtained from tumors of the TR8+CT26 group have lower rates of cellular respiration and acidification of the cell environment compared to the SED+CT26 group. Furthermore, microRNA-array analyzes were performed. Six microRNAs were selected for validation by PCR and among these microRNA-16-2-3p stood out. This microRNA showed decreased expression in the TR8+CT26 group compared to the sedentary group (p=0.03) as observed in the scanning analyzes. In conclusion, AET alters the tumor metabolism contributing to the lower growth of tumors.

Keywords: Colon cancer; glycolysis; tumor proliferation and growth; physical exercise.

Lista de figuras e tabelas

- Figura 1:** Gráficos Adaptados Do *International Agency For Research On Cancer (Who)* Mostrando A) A Taxa De Incidência E De Mortalidade De Diferentes Tipos De Câncer Mundialmente E B) No Brasil. Os Dados São Do Ano De 2020 E Representam Todos Os Sexos E Idades. Os Dados Foram Obtidos No Sítio De Internet Gco.Iarc.Fr..... 20
- Figura 2:** Esquema Adaptado Do Estudo De *Hallmarks Of Cancer: The Next Generation (2)*..... 22
- Figura 3:** Esquema Demonstrando Substratos E Produtos Das Reações Da Glicólise E Principais Enzimas Alostéricas Que Geram Essas Reações. Imagem Adaptada Do Sítio Da Internet [Http://Www.Ledson.Ufla.Br](http://Www.Ledson.Ufla.Br), Tendo Como Autor O Professor Luiz Edison Mota De Oliveira Da Universidade Federal De Lavras..... 26
- Figura 4:** Esquema Demonstrando Substratos E Produtos Das Reações Do Ciclo Do Ácido Cítrico. Imagem Adaptada Do Sítio Da Internet [Http:// Interna.Coceducacao.Com.Br](http://Interna.Coceducacao.Com.Br), Autor Desconhecido. ... 27
- Figura 5:** Figura Esquemática Da Biogênese Dos Micrnas Adaptada De Winter 2009 (87)..... 34
- Tabela 1:** Código Dos Micrnas E Sequências De Pares De Bases De Mrna Usados No Trabalho..... 43
- Figura 6:** Figura Esquemática Do Desenho Experimental Do Estudo, Mostrando O Transcorrer Das Intervenções Ao Longo Do Tempo. Tfa= Treinamento Físico Aeróbico; Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado (Não Previamente A Inoculação); Tr4+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 4 Semanas; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas..... 46
- Figura 7:** (A) Distância Percorrida No Teste Máximo Até Exaustão; (B) Volume Tumoral (Mm³) (C) Correlação Entre Volume Tumoral E Distância Percorrida Até Exaustão (D) Massa Corporal (G). Wt = Grupo Saudável Sedentário; Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado (Não Previamente A Inoculação); Tr4+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 4 Semanas; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. *P<0,05 Vs. Sed+Ct26, **P<0,01 Vs. Sed+Ct26, ***P<0,001 Vs. Sed+Ct26, ****P<0,001 Vs. Sed+Ct26..... 48
- Tabela 2:** Massa Dos Tecidos Corrigido Pelo Comprimento Da Tíbia (G/Mm); (Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas; Wt = Grupo Saudável Sedentário. *P<0,05 Vs. Wt; **P<0,01vs. Wt; ***P<0,001, #P<0,05 Vs. Sed+Ct26)..... 50
- Figura 9:** (A) Delta Da Massa Corporal Em 24 Horas (G); (B) Consumo De Ração Em 24 Horas (G); (C) Consumo De Água Em 24 Horas (ML); (D) Excreção De Fezes Em 24 Horas (G). Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas; Wt = Grupo Saudável Sedentário. *P<0,05..... 51
- Figura 10:** (A) Expressão De Sirt1 (%); (B) Expressão De Sirt3 (%); (C) Expressão De Sirt6 (%). Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas..... 52
- Figura 11:** Dados Preliminares Apresentados Na Proposta De Projeto Apresentado Em 2017. A) Curva De Sobrevida De Pacientes Com Câncer De Cólon. B) Expressão Do Rna Mensageiro Do Gene Sirt6 No Tumor (Células Ct26) C) Volume Tumoral Após 16 Dias Com Células Ct26. Cs = Animais Com Câncer Sedentários (Células Ct26) E Ctr = Animais Com Câncer Treinados (Células Ct26). 53
- Figura 12:** (A) Expressão Do Mirna-33a (%); (B) Expressão Do Mirna-23a (%); (C) Expressão Do Mirna-24. Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. *P<0,05. 53
- Figura 14:** (A) Expressão De Glut1 (%); (B) Expressão De Hk (%); (C) Expressão De Pfk1 (%); (D) Expressão De Pkm1 (%); (E) Expressão De Pkm2 (%); (F) Expressão De Pdha (%); (G) Expressão Pdk

(%); (H) Expressão De Ldha (%). Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. *P<0,05..... 54

Figura 15: Teste De Correlação Entre Volume Tumoral E A) Expressão De Mrna Hif1 α ; B) Expressão De Mrna Glut1; C) Expressão De Mrna Ldha E Expressão De Mrna Pdk1. Para O Teste Utilizou-Se Valores De Animais Dos Grupos Sed+Ct26 E Tr8+Ct26. Considerado Significante Quando P<0,05 E R²>0,3..... 55

Figura 16: Distância Máxima Percorrida No Teste De Esforço Máximo E A) Expressão De Mrna Hif1 α ; B) Expressão De Mrna Glut1; C) Expressão De Mrna Ldha E D) Expressão De Mrna Pdk1. Para O Teste Utilizou-Se Valores De Animais Dos Grupos Sed+Ct26 E Tr8+Ct26. Considerado Significante Quando P<0,05 E R²>0,3..... 56

Figura 17: (A) Expressão De Cs (%); (B) Expressão De Aco1 (%); (C) Expressão De Idh1 (%); (D) Expressão De Idh2 (%); (E) Expressão De Kgdh1 (%); (F) Expressão De Sucla (%); (G) Expressão Sdha (%); (H) Expressão De Fh1 (%); (I) Expressão De Mdh1 (%); (J) Expressão De Mdh1 (%). Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. *P<0,05..... 57

Figura 19: Expressão De Mrna De Sirt6, Sirt1, Sirt3, Pdh1, Pdk1, Pk1, Glut1, Hk, Pkm1, C-Myc E Hif1 α . C.P.Sed+Ct26 (Célula Primárias Originada Dos Tumores Do Grupo Sedentários Ct26) E (Célula Primárias Originada Dos Tumores Do Grupo Treinado Previamente Por 8 Semanas - Ct26). *P<0,05. 60

Figura 20: Teste *Respirômetro De Alta Resolução*. A) Respiração Mitocondrial (U.A) B) *Atp Link – Produção De Atp* (U.A); C) *Capacidade De Reserva* (U.A); D) *Proton Leak – Perda De Prótons* (U.A); E) *Respiração Total* (U.A); F) *Respiração Não Mitocondrial* (U.A). U.A= Unidade Arbitraria. Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. 61

Figura 21: Expressão Proteica De (A) Sirt6, (B) Hif1 α (C) Mapk3, (D) Pmapk3 E (E) Blots Representativos. Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. 62

Figura 22: Expressão Proteica De A) Ci-Nduf8, B) Cii-Sdhd, C) Ciii-Uqcrc2, D) Civ-Mtco, E) Cv-Atp5a E F) Blots Representativos. Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. 63

Figura 23: Expressão Proteica De (A) Pi3k, (B) Bad (C) Mapk-P44-P42, (D) Blots Representativos. Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. 64

Figura 24: Atividade Da Enzima Citrato Sintase (Nmol.Min⁻¹.Mg De Proteína⁻¹). Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas..... 64

Figura 25: (A) Quantificação Do Conteúdo De Glicose-6-Fosfato Nos Tumores; (B) Quantificação Do Conteúdo De Glicose-6-Fosfato Em Células Primárias; (C) Quantificação Do Conteúdo De Frutose-6-Fosfato Nos Tumores. Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário E Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas..... 65

Figura 26: Imuno-Histoquímica De Hif1 α E Sirt6. (A) Figura Ilustrativa Da Marcação De Hif1 α ; (B) Quantificação Da Marcação De Hif1 α (% Da Área); (C) Figura Ilustrativa Da Marcação De Sirt6; (D) Quantificação Da Marcação De Sirt6 (% Da Área). Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário E Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas..... 66

Figura 27: (A) Figura Ilustrativa Da Marcação De Hematoxilina E Eosina, *Picrosirius* E *Oil Red*; (B) Quantificação Da Área De Necrose (% Da Área); (C) Quantificação Da Marcação Por *Oil Red* (% Da Área); (D) Quantificação Da Marcação Por *Picrosirius* (% Da Área). Sed+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário E Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas. 67

Figura 28: A) Figura Ilustrativa Demonstrando A Separação De Genes De Acordo Com O Grupo Experimental; B) Separação De Componentes/Genes De Acordo Com As Análises De Pca.	68
Figura 29: Figura Ilustrativas Demonstrando Os Genes Que Foram Selecionados Pelas Análises De Pca E Fold3.	69
Figura 30: Figura Ilustrativa Demonstrando A) Genes Alvos Do Microrna-16-2-3p Mais Expressos No Transcriptoma (104); B) Vias Predominantes Na Plataforma Go-Função Muscular (Score Combinado); C) Vias Predominantes Na Plataforma Kegg-2021 (Score Combinado). .. Erro! Indicador não definido.	
Figura 31: Figura Ilustrativa Demonstrando A) Genes Alvos Do Microrna-29b-5p Mais Expressos No Transcriptoma (104); B) Vias Predominantes Na Plataforma Go-Função Muscular (Score Combinado); C) Vias Predominantes Na Plataforma Kegg-2021 (Score Combinado). .. Erro! Indicador não definido.	
Figura 32: Figura Ilustrativa Demonstrando A) Genes Alvos Do Microrna-135-2-3p Mais Expressos No Transcriptoma (104); B) Vias Predominantes Na Plataforma Go-Função Muscular (Score Combinado); C) Vias Predominantes Na Plataforma Kegg-2021 (Score Combinado). .. Erro! Indicador não definido.	
Figura 33: Figura Ilustrativa Demonstrando A) Genes Alvos Do Microrna-299-3p Mais Expressos No Transcriptoma (104); B) Vias Predominantes Na Plataforma Go-Função Muscular (Score Combinado); C) Vias Predominantes Na Plataforma Kegg-2021 (Score Combinado). .. Erro! Indicador não definido.	
Figura 34: Figura Ilustrativa Demonstrando A) Genes Alvos Do Microrna-181d-3p Mais Expressos No Transcriptoma (104); B) Vias Predominantes Na Plataforma Go-Função Muscular (Score Combinado); C) Vias Predominantes Na Plataforma Kegg-2021 (Score Combinado). .. Erro! Indicador não definido.	
Figura 35: Figura Ilustrativa Demonstrando A) Genes Alvos Do Microrna-410-5p Mais Expressos No Transcriptoma (104); B) Vias Predominantes Na Plataforma Go-Função Muscular (Score Combinado); C) Vias Predominantes Na Plataforma Kegg-2021 (Score Combinado)	76
Figura 36: Expressão Do Microrna-16-2-3p (% Do Controle). Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas.	77
Figura 37: Figura Ilustrativa Demonstrando A Formação De <i>Clusters</i> Com Genes Alvos Do Microrna-16-2-3p Selecionados Para Confirmação Por Pcr.	78
Figura 38: Expressão Gênica De A) <i>Insr</i> (% Do Controle); B) <i>Angpt1</i> (% Do Controle) C) <i>Igfr1</i> (% Do Controle), D) <i>Camkd2</i> (% Do Controle); E) <i>Bcl2</i> (% Do Controle) E F) <i>Pi3kr2</i> (% Do Controle). Sed+Ct26 Grupo Câncer De Cólon Ct26 Sedentário; Tr8+Ct26 = Grupo Câncer De Cólon Ct26 Treinado Previamente Por 8 Semanas.	78

Lista de abreviações

Acetil-CoA - Acetilcoenzima A
AKT2 - Treonina-proteína quinase 2
AMPK - Proteína quinase ativada por AMP
ANGPT1 - Angiopietina 1
ATP -Trifosfato de adenosina
BCL2 - B-cell lymphoma 2
C.P.SED+CT26 - Célula primárias originada dos tumores do grupo sedentário CT26
C.P.TR8+CT26 - Célula primárias originada dos tumores do grupo treinado previamente por 8 semanas - CT26
CAMK2D - A cadeia delta tipo II da proteína quinase dependente de cálcio
CTC - Células tumorais circulantes
ECAR - Taxa de acidificação extracelular
ELOC - Elogin C
FADH2 - Dinucleotideo de flavina e adenina
GLUT1 - Transportador de glicose 1
HIF1 α - Fator de Indução de Hipóxia 1-alfa
HK - Hexoquinase
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGF1R - Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1
INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INSR - Receptor de insulina
LDH - Lactato desidrogenase
LDHa - Lactato desidrogenase A
NAD⁺ - Dinucleotideo de nicotinamida e adenina
NCI - *National Cancer Institute*
OCR - Taxa de consumo de oxigênio
OXPHOS - Cadeia respiratória (do inglês *Oxidative phosphorylation ou electron transport-linked phosphorylation*)
PDK - Piruvato desidrogenase quinase
PDK1 - Piruvato desidrogenase quinase 1
PFK-1 - Fosfofrutoquinase 1
PFKFB3 - 6-fosfofructo-2-quinase / frutose-2,6-bifosfatase 3
PIK3CA - fosfoinositide-3-quinase catalítica
PIK3R1 - subunidade reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase alfa
PKM1 - Piruvato quinase M1
PKM2 - Piruvato quinase M2
proteínas RB - Proteína associada ao retinoblastoma
RPS6KB1 - A proteína ribossômica S6 quinase beta-1
SED+CT26 - Câncer sedentário
SIRT1 -Sirtuína 1
SIRT3 - Sirtuína 3
SIRT4 - Sirtuína 4
SIRT5 - Sirtuína 5
SIRT6 - Sirtuína 6
SIRT7 - Sirtuína 7
TFA -Treinamento físico aeróbico
TR+CT26 - Câncer treinado
TR4+CT26 - Câncer treinado quatro semanas antes do inóculo das células tumorais
TR8+CT26 - Câncer treinado oito semanas antes do inóculo das células tumorais
WHO - *World Health Organization*
WT - Controle saudável sedentário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVO	19
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	19
4. REVISÃO DE LITERATURA	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 MANEJO ANIMAL	36
5.2 CULTURA CELULAR.....	36
5.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	38
5.4 EXPRESSÃO PROTEICA.....	39
5.5 EXPRESSÃO GÊNICA	40
5.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	44
5.7 ANÁLISES <i>IN-SILICO</i>	44
5.8 ESTATÍSTICA	45
6. RESULTADOS	46
6.1 DESENHO EXPERIMENTAL	46
6.2 MARCADORES DE TREINAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS	47
6.3 MASSA DOS TECIDOS E CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO	49
6.4 GENES AVALIADOS NO TUMOR	51
6.5 CULTURA CELULAR: SEAHORSE E EXPRESSÃO GENICA.....	58
6.6 CULTURA CELULAR: RESPIRÔMETRO DE ALTA RESOLUÇÃO.....	60
6.7 EXPRESSÃO PROTEICA E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	60
6.8 MARCADORES HISTOLÓGICOS	65
6.9 ANÁLISE <i>IN-SILICO</i> - MICRORNA-ARRAY E CONFIRMAÇÃO DE ALVOS	67
7 DISCUSSÃO	67
7.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ANDAMENTO DO PROJETO E PRÓXIMO PASSOS.....	86
8. REFERÊNCIAS	86

1. Introdução;

O os diversos tipos de cânceres são distintos entre si, mas se assemelham por um caráter crônico, degenerativo e progressivo (1). A origem do câncer se dá por mutações gênicas em células de um dado tecido, o acúmulo de células mutadas originam os tumores, e o crescimento tumoral ocorre pela característica dessas células de evadir a sinais de controle de crescimento, proliferação e morte (1,2). Entretanto, tumores são mais do que um aglomerado de células cancerosas; eles são um tecido complexo formado por uma população de células diversas, tais como fibroblastos, células do sistema imune e células endoteliais, que agem sinergicamente compondo um microambiente tumoral (2,3). Sendo assim, pode se afirmar que a heterogeneidade dos cânceres também ocorre pelas diferenças nas mais diversas formas de mutação celular e as mais diversas formas de configuração de populações celulares em um tumor (1,2).

Hanahan e Weinberg descreveram algumas características comuns da maioria das células cancerosas nos reconhecidos trabalhos “*hallmarks of cancer*”(1) e “*hallmarks of cancer: the next generation*” (2) publicados na revista *Cell* nos anos de 2000 e 2011, respectivamente (2). Três dessas características se sobressaem nesse trabalho como objeto de estudo para formulação das hipóteses, sendo elas: sinais sustentados de proliferação celular, evasão da supressão de crescimento celular e alterações no metabolismo celular. Salienta-se que as alterações no metabolismo celular apresentam maior relevância para o estudo.

As alterações no metabolismo das células neoplásicas possibilitam a sobrevivência, evasão de sinais de controle de proliferação, crescimento e morte celular (2). Alterações no metabolismo central de carbono (referência ao conjunto de reações da glicólise e do ciclo do ácido cítrico) são muito investigadas em neoplasias, uma vez que apresentam papel preponderante na manutenção da proliferação e crescimento sustentado (4–6).

As alterações comuns no metabolismo central de carbono são o aumento da captação e catabolismo de glicose pelas células cancerosas. Outra alteração metabólica comum é a utilização das reações da glicólise para obtenção de energia e pouca utilização do ciclo do ácido cítrico e respiração celular para aporte energético, mesmo na presença de oxigênio. Esse fenômeno é conhecido como glicólise aeróbica ou “efeito Warburg” (6).

A eficiência da glicólise na produção de ATP é 18 vezes menor do que a oxidação desse substrato, mas as células cancerosas compensam esse prejuízo aumentando de forma acentuada a expressão de transportadores de glicose, principalmente do receptor de membrana transportador de glicose 1 (GLUT1), esse mecanismo aumenta substancialmente a quantidade de glicose no citoplasma. O aumento acentuado do transporte e utilização de glicose foram documentadas em muitos tipos de tumores humanos (7).

Muitos mecanismos moleculares estão relacionados com a reprogramação metabólica, de modo que uma das possíveis causas desse fenômeno é a alteração na expressão de genes e proteínas que agem como reguladores metabólicos, tais como as sirtuínas.

As sirtuínas são deacetilases de histonas dependente de NAD^+ . Existem sete isoformas de sirtuínas expressas em mamíferos, algumas dessas agem como reguladores do metabolismo em muitos tecidos. Existem numerosos resultados experimentais que sustentam uma relação entre sirtuínas e alteração metabólicas em tumores (8).

A sirtuína 3 (SIRT3) e a SIRT6 estão localizadas em compartimentos mitocondriais e nucleares respectivamente e apresentam como uma das suas funções reprimir a glicólise através da inibição de genes que codificam enzimas dessa via (9). Assim, a diminuição da expressão de SIRT3 e/ou SIRT6 induz a maior atividade da via glicolítica. Evidências apontam que tumores de cólon humanos e murinos apresentam diminuição da expressão de SIRT6 e esse fator está associado com reprogramação metabólica e a malignidade da doença (9,10)

O principal motivo para ausência de SIRT6 ocasionar essas alterações metabólicas é que essa proteína age como um silenciador de genes da via glicolítica, tais como lactato desidrogenase (LDH), transportador de glicose 1 (GLUT1), fosfofrutoquinase 1 (PFK-1) e piruvato desidrogenase quinase (PDK) (11). O mecanismo para tal fenômeno é que SIRT6 causa a deacetilação da histona H3K9 gerando o silenciamento dos genes citados. Animais *knockout* para SIRT6 apresentam maior acetilação da histona H3K9 e também o aumento de genes da via glicolítica (11).

SIRT6 também está associada com o controle da expressão do Fator de Indução de Hipóxia 1 - alfa ($\text{HIF1}\alpha$) (10). Quando a expressão de SIRT6 está diminuída ocorre o aumento da expressão de $\text{HIF1}\alpha$, havendo dessa forma um balanço entre esses dois genes. Isso se dá pelo fato de SIRT6 deacetilar a histona H3K9 e em consequência inibir a tradução de $\text{HIF1}\alpha$, além das outras proteínas da via glicolítica já citadas. A importância desse processo é que $\text{HIF1}\alpha$ age promovendo o aumento de genes da via glicolítica e está relacionado com o escape das vias oxidativas mesmo na presença de oxigênio (10). SIRT6 ainda está relacionada com o metabolismo ribossomal, pois controla a expressão do gene c-MYC, que por sua vez tem o papel de reguladora da da gênese dos ribossomos e controla o crescimento tumoral (12).

Por outro lado, o treinamento físico aeróbico (TFA) também promove a mudança do metabolismo de diversos tecidos, principalmente no músculo cardíaco e esquelético. Entretanto, em oposição ao que acontece no câncer, o metabolismo se altera para o perfil oxidativo e genes envolvidos nessa via são mais expressos (13). A literatura aponta que o TFA diminui a progressão tumoral (14,15) e recentemente o nosso grupo de pesquisa encontrou o mesmo

resultado em animais com câncer de cólon, onde observamos menor crescimento tumoral em animais treinados (dados não publicados).

Evidências na literatura indicam que o TFA é capaz de alterar a expressão dos microRNAs; uma classe de pequenas moléculas responsáveis pelo controle dos processos biológicos de modo pós-transcricional (16–18). Os microRNAs estão associados com diversas doenças contribuindo para iniciação, manutenção e agravamento dos processos patológicos, dentre essas estão as doenças neoplásicas (19,20). O TFA já foi demonstrado como um dos possíveis reguladores da expressão de microRNAs descompensados em processos patológicos (21–23)

O microRNA-33a-3p tem como um de seus alvos a proteína SIRT6 (24), entretanto não há estudos que mostrem a participação desse microRNA no controle do metabolismo tumoral, apesar de haver descrições na literatura sobre a sua participação no controle de vias de proliferação e iniciação tumoral.

Tendo em vista, que não há estudos que mostram o papel do TFA regulando a expressão de genes que exercem controle no metabolismo tumoral, nosso objetivo é testar as seguintes hipóteses:

- 1- Se o TFA prévio diminui a progressão tumoral e aumenta a sobrevida dos animais;
- 2- Se o aumento da progressão tumoral está relacionado com a diminuição da expressão da proteína SIRT6 e o aumento do microRNA 33a-3p. Ainda, avaliar o papel do TFA nesse eixo;
- 3- Se o microRNA-*array* mostrará outros microRNAs diferentemente expressos nos tumores de camundongos com câncer sedentários e treinados, os quais possam ter relação com outras vias metabólicas relacionadas com a progressão tumoral.

2. Justificativa;

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e apresenta uma taxa de mortalidade alarmante. Estudo recente tem apontado que a progressão tumoral e agressividade das doenças neoplásicas está vinculada com a reprogramação metabólica. Segundo nosso conhecimento não há estudos que investigaram o papel do TFA na modulação dos microRNAs e da reprogramação metabólica, embora seja conhecido que o exercício físico atenua a progressão tumoral. Dessa forma nosso foco foi investigar se uma das maneiras pela qual o TFA atenua a progressão tumoral é através do controle da reprogramação metabólica e modulação da expressão dos microRNAs.

3. Objetivo;

Avaliar o papel do TFA sobre 1) o metabolismo central de carbonos e 2) a expressão da proteína SIRT6 e do microRNA-33a-3p em tumores ortotópicos de cólon; também analisar o envolvimento dos aspectos citados com a progressão tumoral. Além de realizar um teste de varredura a fim de encontrar microRNAs diferentemente expressos entre animais treinados e sedentários e que podem influenciar o metabolismo tumoral.

3.1 Objetivo específico

➤ **Estudo 1** – Avaliar a progressão tumoral no modelo de câncer de colón CT26, analisando os seguintes aspectos:

- Realizar protocolo de TFA com diferentes tempos, i) 4 semanas prévias ao inóculo de células CT26, ii) 8 semanas antes dos inóculo das células CT26 e iii) início do treinamento concomitante com o inóculo. Após o término do protocolo escolher um grupo de melhor resposta baseado nos testes de desempenho da capacidade aeróbica e fenótipo do tumor;

- Analisar sobrevida, consumo de ração e água no grupo treinado de melhor resposta.

➤ **Estudo 2** – Investigar o papel da proteína SIRT6 e do microRNA-33a-3p no controle do metabolismo e na progressão tumoral no grupo de melhor resposta.

- Analisar a expressão gênica e proteica de SIRT6 no tumor dos animais CT26.

- Analisar a expressão de genes glicolíticos no tumor dos animais CT26.

- Analisar a expressão gênica e proteica de HIF1 α e c-MYC no tumor dos animais CT26.

- Analisar a expressão do microRNA-33a-3p no tumor dos animais CT26.

- Superexpressar e/ou inibir o microRNA-33a-3p em células de tumor de cólon e avaliar a viabilidade, proliferação, tamanho e consumo de glicose.

- Inocular animais com as células com alterações na expressão do microRNA

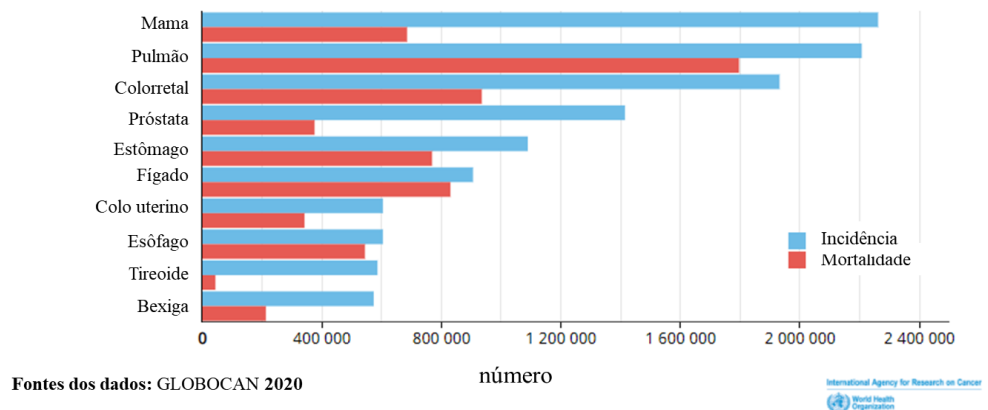
➤ **Estudo 3** – Realizar o experimento de *microRNA-array* buscando novos microRNAs e validar novos alvos relacionados com metabolismo das células tumorais comparando animais sedentários e treinados.

4. Revisão de literatura

Câncer, *hallmarks* e o papel do exercício físico:

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo que 19,2 milhões de adultos no mundo foram diagnosticados com câncer em 2020 e desse total 9,9 milhões (51,5%) de pessoas morreram em decorrência da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2021). Esse valor corresponde a 22% do total de mortes por doenças não infecciosas (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2021). Mais de 60% do total de novos casos de câncer ocorrem na África, Ásia e América Central e do Sul. Essas regiões são responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo (WHO, 2021). Mundialmente o câncer de cólon apresenta uma incidência de 19,5 casos a cada 100 mil pessoas e a taxa de mortalidade é de 9 a cada 100 mil pessoas, sendo o terceiro tipo de câncer mais incidente no mundo. No Brasil esses números são bastante semelhantes onde a incidência e a mortalidade são 17,4 e 8,4 a cada 100 mil habitantes, respectivamente (WHO,2021) (Figura 1).

A Taxa estimada de incidência e mortes por câncer no mundo em 2020 (ambos os sexos e todas as idades)



B Taxa estimada de incidência e mortes por câncer no Brasil em 2020 (ambos os sexos e todas as idades)

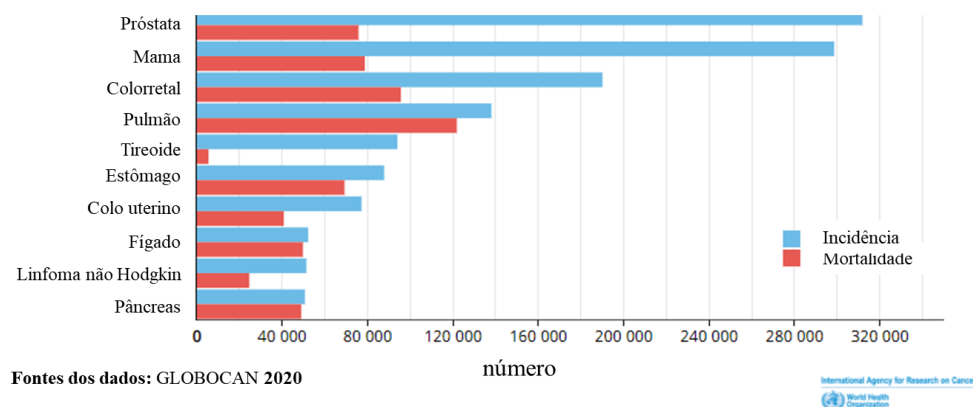


Figura 1: Gráficos adaptados do *International Agency for Research on Cancer* (WHO) mostrando A) a taxa de incidência e de mortalidade de diferentes tipos de câncer mundialmente e B) no Brasil. Os dados são do ano de 2020 e representam todos os sexos e idades. Os dados foram obtidos no site de internet gco.iarc.fr.

Os cânceres são originados por acúmulos de mutações celulares que levam ao crescimento celular desordenado em um determinado órgão ou tecido (National Cancer Institute - NCI, 2021). Os mecanismos de carcinogênese são complexos e múltiplos e são resultados da ação de agentes carcinógenos químicos, físicos, biológicos e genéticos (25). O processo de carcinogênese pode ser dividido em pelo menos três estágios: iniciação, promoção e progressão (25). O primeiro estágio da carcinogênese, a iniciação, resulta de uma alteração genética irreversível, promovida por uma ou mais mutações que levam a alterações no DNA(25). O estágio de promoção não envolve mudanças na estrutura do DNA, mas sim na expressão do genes onco-promotores que possibilitam alterações celulares e o desenvolvimento da doença (25). A progressão é o estágio onde ocorrem as manifestações clínicas do câncer, nesse estágio encontram-se uma série de genes com expressão alterada, sendo eles proto-oncogenes, oncogenes e supressores de tumor, e diversas mutações no genoma (25–27).

A comunidade científica tem lançado grandes esforços para ampliar o entendimento sobre a doença e desenvolver novas terapias. O maior desafio para tratamento dos mais diferentes cânceres ocorre porque os mecanismos de carcinogênese são distintos em cada tipo de câncer (25); diferentes mutações são geradas em diferentes populações de células, levando a diferentes fases de promoção e progressão da doença, dessa forma não há um padrão nas células tumorais (2).

Entretanto, Hanahan e Weinberg descreveram algumas características comuns para maioria das células cancerosas, essas características são conhecidas como “hallmarks of cancer” (1,2). Os autores destacam 10 características, sendo elas: 1) Sinais sustentados de proliferação celular, 2) evasão da supressão de crescimento celular, 3) evasão do controle imunológico, 4) alto potencial replicativo e imortalidade, 5) promoção de inflamação, 6) ativação de invasão e metástase, 7) indução de angiogênese, 8) instabilidade genômica e acúmulo de mutações, 9) resistência a morte celular e 10) alterações no metabolismo celular (Figura 2).



Figura 2: Esquema adaptado do estudo de *Hallmarks of cancer: the next generation* (2).

A presente tese destacará três dessas características que são essenciais para o entendimento da mesma, sendo elas: 1) Sinais sustentados de proliferação celular, 2) evasão da supressão de crescimento celular e 3) alterações no metabolismo celular.

1) Sinais sustentados de proliferação celular: Os tecidos normais controlam cuidadosamente a liberação de fatores de crescimento e proliferação, assim regulando o ciclo celular e assegurando a arquitetura e função adequada do tecido (2). Entretanto as células cancerosas apresentam esses sinais de proliferação descompensados, não respeitando os controles do ciclo celular, levando a uma proliferação celular exacerbada sem a preservação do arranjo morfológico e da função do tecido (2).

Os sinais de proliferação são transmitidos, em grande parte, por fatores de crescimento que se ligam a receptores de superfície celular, tipicamente contendo domínios intracelulares de tirosina quinase (28–30). Estes últimos, por sua vez, emitem sinais através de vias de sinalização intracelulares que regulam proliferação, ciclo celular e crescimento celular. Muitas vezes, esses sinais influenciam ainda outras propriedades biológicas das células, como a sobrevivência celular e o metabolismo energético (28–30).

As células cancerígenas podem adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa de várias formas; através de estimulação autócrina, onde as células produzem ligantes que interagem com seus próprios receptores de membrana. Alternativamente, as células cancerosas podem enviar sinais para estimular as células normais dentro do estroma associado

ao tumor; as células do estroma por sua vez destinam fatores de crescimento as células cancerosas (31,32). Ainda, o número de receptores de membrana podem ser aumentados tornando essas células muito responsivas a quantidades pequenas de ligante de fatores de crescimento; o mesmo resultado pode ocorrer por alterações estruturais nos receptores de membrana que facilitam a sinalização intracelular independente de ligantes (2).

2) Evasão de supressores de crescimento celular: Além da capacidade de sustentar sinais que estimulam a proliferação, as células cancerosas também evadem a programas celulares que regulam negativamente o crescimento celular (2). Muitos desses programas dependem da ação de supressores de tumor que são genes/proteínas que tem como função limitar o crescimento e proliferação celular (2). As proteínas RB (proteína associada ao retinoblastoma) e P53 são as mais estudadas como supressores de crescimento celular, elas operam como controladoras de mecanismos celulares relacionados com proliferação, senescência e apoptose (33). Em muitos tipos de câncer os genes que codificam essas proteínas apresentam mutações e impedem a tradução proteica ou gerando proteínas disfuncionais (2).

3) Alterações no metabolismo celular: Visto que as doenças neoplásicas têm como uma das características principais a proliferação celular descontrolada, se faz necessário um grande aporte energético que dê suporte para o crescimento celular aumentado (34). Em condições normais a maior parte das células saudáveis usam o metabolismo oxidativo e visam manter a homeostase, entretanto as células cancerosas em grande parte priorizam o metabolismo glicolítico e visam promover o crescimento, proliferação e sobrevivência (2,35).

O metabolismo glicolítico é priorizado pois o mesmo está associado com a ativação de oncogenes tais como RAS e c-MYC e pela ausência de supressores tumorais, por exemplo o p53 (7). Esse metabolismo também traz vantagens para as células cancerosas, pois auxilia no escape de sinais de apoptose, permite o desvio de intermediários glicolíticos em várias vias biosintéticas, incluindo aquelas que geram nucleotídeos e aminoácidos; facilitando a formação de novas células, além de auxiliar na evasão de controle citostático (2,7). Essa dependência da glicólise pode ser ainda mais acentuada sob condição de hipóxia, fenômeno comum em muitos tumores (6,36,37). Uma das respostas celulares a hipóxia é aumentar a sinalização, através de fatores de transcrição, que desencadeia aumento de receptores de membrana que captam glicose e aumento de enzimas da via glicolítica (2,7).

O papel do TFA nos *Hallmark* do câncer:

Ruiz-Casado e colaboradores em 2017 realizaram uma revisão com o objetivo de descrever o efeito da atividade de física no câncer, o grupo se baseou no trabalho clássico de Hanahan e

Weinberg e descreveram o papel da atividade física sobre os já conhecidos *hallmarks* do câncer (38).

A importância desse trabalho se dá pois nos últimos anos a atividade física vem sendo estudada como uma possível terapia complementar para o tratamento do câncer. Evidências acumuladas mostram que em modelos animais o exercício físico contribui para diminuição da progressão tumoral (14,39), aumento da angiogênese funcional em tumores (15,40) e melhora da entrega de drogas anticâncer (15,40). Em pesquisa em humanos há evidências que a prática regular de atividade física diminui a incidência de diversos tipos de câncer (41) e contribui para a melhoria do bem-estar psicossocial do paciente (42).

Ainda, sabe-se que a crescente incidência do câncer mundialmente está associada com a também crescente taxa de inatividade física. Aproximadamente um terço dos adultos em todo o mundo são fisicamente inativos; ou seja, eles não atendem aos níveis mínimos de 150 min / semana de atividade física moderada-vigorosa recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016).

Moore e colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a relação da prática de atividade física com a incidência de cânceres, para isso os pesquisadores colheram dados de 1,44 milhão de participantes de diferentes coortes da Europa e dos Estados Unidos, desses participantes 186.932 apresentaram cânceres (41). A pesquisa mostra que a atividade física vigorosa no lazer é associada a um risco significativamente menor de dez tipos de câncer, mesmo após ajustes para fatores de risco incluindo adiposidade e tabagismo (exceto para câncer de pulmão) (41). A atividade física regular também está associada a um menor risco de mortalidade por câncer, particularmente de mama e colorretal (43,44). Ainda, atletas de elite que realizam maiores cargas de exercício ao longo dos anos comparado com a população geral, apresentam risco muito menor de mortalidade geral por câncer (43,44).

Ruiz-Casado e colegas também destacam que cada uma das características do câncer descrito por Hanahan e Weinberg é em certa medida dirigida de forma independente. Portanto, identificar os principais efeitos da atividade física no câncer em relação a um *hallmark* pode ser especialmente útil para a orientação de futuros esforços da comunidade científica (38). Entretanto, poucos são os estudos que apontam o papel do TFA atuando diretamente nos *hallmarks* do câncer. Em especial para essa tese, poucos são os estudos que mostram que o TFA altera o metabolismo do tumor.

Lu e colaboradores foram um dos poucos a demonstrar os efeitos do TFA na reprogramação metabólica no câncer. Os pesquisadores utilizaram um modelo animal xenográfico, onde fragmentos tumores derivados de pacientes de cólon foram transplantados em animais com

sistema imune deficiente, os pesquisadores então treinaram esses animais em sistema voluntário de corrida. Foi observado através de cromatografia líquida que o TFA diminui produtos da glicólise, tais como frutose-1-6-bifosfato, gliceraldeído-3-fosfato e fosfoenolpiruvato. Também observaram que produtos do ciclo do ácido cítrico são também diminuídos tal como malato e fumarato. A produção de ATP também é menor mostrando uma diminuição de OXPHOS. Todos esses dados são acompanhados de menor proliferação do tumor (39).

Metabolismo central de carbonos e reprogramação metabólica no câncer:

A reprogramação metabólica em células tumorais é um processo complexo e não é circunscrito a poucas vias de catabolismo e síntese de nutrientes, assim como mencionado o alterações no metabolismo das células cancerosas depende de ativação de diversos genes (oncogenes, supressores tumorais e fatores de transcrição) e das características do tumor assim como seu microambiente tumoral (37,45,46). Por outro lado, apesar da complexidade do metabolismo tumoral, a literatura científica apresenta grande número de estudos principalmente sobre as vias relacionados ao metabolismo central de carbonos, que apresentam estudos datados há mais de cem anos (47–50).

As reações que ocorrem no metabolismo central de carbono têm como último produto o trifosfato de adenosina (ATP), um composto com alto potencial energético que funciona como principal veículo de energia química (51). Em geral, a síntese de moléculas de ATP ocorre a partir de reações que se iniciam com a processamento de substratos complexos, os mamíferos utilizam prioritariamente três desses: gorduras, proteínas e carboidratos (51).

A maioria das células usa glicose (produto da clivagem de carboidratos) para a síntese de ATP, para isso dois processos são demandados 1) glicólise e 2) ciclo do ácido cítrico (51). A glicólise é uma sequência de dez reações catalisadas por enzimas citoplasmáticas que oxidam a glicose e geram como produto duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e dois moléculas de NADH⁺ (Figura 3). O piruvato pode ser reduzido a lactato ou ser encaminhado para a mitocôndria para o ciclo do ácido cítrico onde sofrerá novas reações de oxidação.

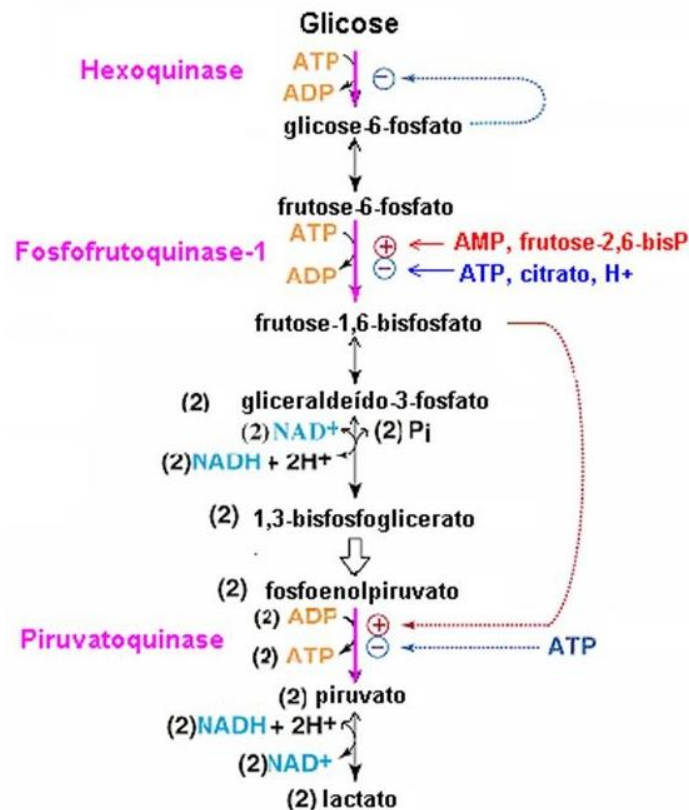


Figura 3: Esquema demonstrando substratos e produtos das reações da glicólise e principais enzimas alostéricas que geram essas reações. Imagem adaptada do sitio da internet <http://www.ledson.ufla.br>, tendo como autor o Professor Luiz Edison Mota de Oliveira da Universidade Federal de Lavras.

O ciclo do ácido cítrico é conjunto de oito reações característico de organismos aeróbicos, ou seja, que utilizam oxigênio para produção de energia. O ciclo se inicia com a conversão de piruvato em acetil-COA. Este composto reage com o oxaloacetato, que é um produto do ciclo anterior, formando citrato. O citrato origina isocitrato e na sequência alfa-cetoglutarato e NADH₂. Por sua vez, o alfa-cetoglutarato vai dar origem a outros compostos seguido de uma série de reações enzimáticas, a última reação gera oxaloacetato, dessa forma retomando o ciclo, os produtos dessas séries de reações são moléculas de NADH₂ e FADH₂ (Figura 4). Todas as moléculas de NADH produzidas na glicólise e de NADH e FADH no ciclo do ácido cítrico são destinadas a cadeia respiratória (OXPHOS do inglês *Oxidative phosphorylation* ou *electron transport-linked phosphorylation*); sendo essa uma das etapas da respiração celular, que se caracteriza pelo transporte de elétrons para membrana interna das mitocôndrias que tem como produto final a síntese de ATP (51).

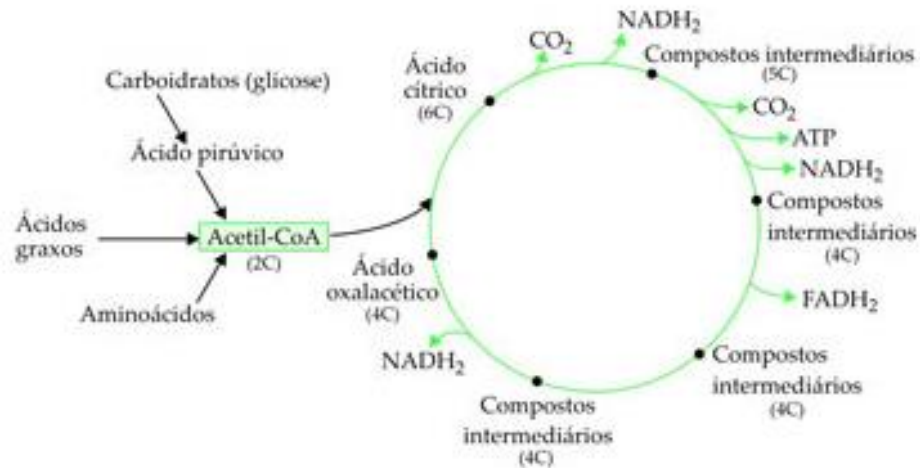


Figura 4: Esquema demonstrando substratos e produtos das reações do ciclo do ácido cítrico. Imagem adaptada do sitio da internet [http:// interna.coceducacao.com.br](http://interna.coceducacao.com.br), autor desconhecido.

Glicólise aeróbica e câncer – Efeito Warburg:

O metabolismo central de carbono em grande parte das células cancerosas se comporta de modo distinto de células normais. Em 1924, o fisiologista alemão Otto Warburg foi o primeiro a observar esse comportamento anômalo no metabolismo celular no câncer (47), onde as células priorizam o uso da glicose no citosol mais do que no ciclo dos ácidos tricarbóxicos na mitocôndria como a maior parte das células para produzir energia. O fenômeno chamado glicólise aeróbica ou “efeito Warburg” é comum em células de diversos tipos de câncer, onde mesmo na presença de oxigênio as células cancerosas utilizam apenas da glicólise para obtenção de energia (52).

A eficiência da glicólise na produção de ATP é menor do que a oxidação total desse substrato. No entanto, a produção de lactato a partir da glicose ocorre 10 a 100 vezes mais rápido que a oxidação completa da glicose na mitocôndria. A quantidade de ATP sintetizada na glicólise em relação ao período de tempo utilizado é comparável com a síntese do ATP na mitocôndria (53).

Ainda, as células cancerosas aumentam de forma acentuada a expressão de transportadores de glicose, principalmente do receptor de membrana GLUT1, esse mecanismo aumenta de forma substancial a quantidade glicose no citoplasma. O aumento acentuado do transporte e utilização de glicose foram documentadas em muitos tipos de tumores humanos (7). Outras enzimas glicolíticas também apresentam expressão alterada em determinados tumores e contribuem para a reprogramação metabólica que gera aumento da glicólise, tais como lactato desidrogenase A (LDHa), piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1), piruvato quinase M1 (PKM1), piruvato quinase M2 (PKM2), hexoquinase (HK) e fosofruuto quinase – 1 (PFK1) (54–58).

O efeito de Warburg também é proposto como um mecanismo adaptativo para suportar a proliferação descontrolada. Nesse cenário, o aumento do consumo de glicose é usado como fonte de carbono para os processos anabólicos necessários para a proliferação celular (59). Uma vez que os carbonos da glicose não são totalmente oxidados hipotetiza-se que estes sejam desviados para vias de síntese de nucleotídeos, lipídios e proteínas, por exemplo via das pentoses fosfato (59). No entanto, a literatura não apresenta consenso sobre esta hipótese. Uma das limitações para essa função proposta do efeito Warburg é que durante a glicólise aeróbica a maior parte dos carbonos são secretados como lactato, ou seja carbonos são clivados até um produto final da glicólise e os carbonos restantes que se encontram na forma de lactato são secretados pelas células (4,60). Além disso, existem evidências na literatura que componentes do ciclo do ácido cítrico são mais utilizados pelas células para biossíntese de nucleotídeos, aminoácidos e lipídios (61,62). Dessa forma, ainda não é claro como o Efeito Warburg promove diretamente essa biossíntese.

A mudança do metabolismo de células tumorais que levam ao efeito Warburg de modo canônico (Glicólise como única via energética utilizada e total desvio do ciclo do ácido cítrico) também não é um consenso na literatura, muito embora experimentos que confirmam o efeito Warburg foram replicados ao longo das últimas décadas e o crescimento dos estudos sobre esse tema tenham aumentado de maneira exponencial (63). Entretanto, Courtney e colaboradores forneceram evidências experimentais em pacientes humanos com carcinoma renal de que as alterações metabólicas propostas por Warburg realmente ocorrem em certos contextos. Células de carcinoma renal primárias (ccRCC) de cinco pacientes foram colocadas em cultura. Células ccRCC demonstraram uma maior marcação dos metabólitos glicoproteicos, uma redução concomitante na marcação dos metabólitos do ciclo do ácido cítrico, além de apresentarem uma fração reduzida de Acetil-COA. Estes achados definem um fenótipo metabólico caracterizado por utilização da oxidação da glicose em favor da glicólise aeróbica, em consonância com a visão clássica do efeito Warburg (64).

As observações de Courtney *et al*, estão correlacionadas com um perfil de expressão gênica alterado; os pesquisadores encontraram que em células ccRCC há uma menor expressão do gene supressor tumoral Von Hippel–Lindau (VHL). Este gene é conhecido como um supressor tumoral, ainda VHL codifica um componente E3 ubiquitina ligase que é tem como função a degradação dos fatores induzidos por hipóxia HIF1 α e HIF2 α . O papel de HIF1 α será discutido com mais detalhes posteriormente, mas por hora cabe salientar que esse gene é um regulador da glicólise. Dessa forma, é possível deduzir que o estado hipóxico induzido por HIF1 α pode promover o efeito canônico de Warburg (64).

OXPHOS e câncer:

Herbert Crabtree estendeu o trabalho de Warburg no início do século XX e estudou a heterogeneidade do metabolismo da glicose em diferentes tipos de tumor. Ele confirmou as descobertas de Warburg, mas descobriu que a OXPHOS nos tumores era variável, com muitos tumores exibindo uma quantidade substancial de respiração celular. Portanto, Crabtree concluiu que não só as células tumorais exibem glicólise aeróbica, mas que também há variabilidade na OXPHOS (65).

Nos últimos anos, foi demonstrado que os tumores de pulmão (66), fígado (67), bem como tumores cerebrais primários e metastáticos (68) exibem níveis significativos e até elevados de oxidação completa da glicose. Certos cânceres permanecem dependentes da função mitocondrial *in vivo* (69,70). Os trabalhos sugerem que a reprogramação metabólica é condicionada a expressão de oncogenes, supressores tumorais e ao microambiente que o tumor está inserido.

As observações de Yuneva e colaboradores apontam que no câncer de pulmão de não pequenas (*non small cells lung cancer* – NSCLC) apesar da glicose ser totalmente oxidada o efeito Warburg não pode ser descartado, os pesquisadores sugerem que essas células tumorais adquirem a capacidade de apresentar de modo exacerbado a glicólise aeróbia (característica pela produção de lactato), entretanto em menor magnitude essas células também apresentam OXPHOS, sendo essa uma vantagem adaptativa para proliferação, uma vez que a produção de ATP é aumentada de modo substancial (66).

Dupuy e colaboradores também demonstraram que células do câncer de mama também apresentam glicólise aeróbica e OXPHOS de maneira concomitante. Entretanto, os pesquisadores observaram que células de câncer de mama com um caráter menos metastático, 67NR e 66cl4, apresentavam o metabolismo OXPHOS mais pronunciado, enquanto que células de câncer de mama altamente metastáticas, 4T1, apresentam um aumento do metabolismo glicolítico e pouco uso de OXPHOS (apesar de genes e metabólitos dessas vias serem presentes em baixa expressão). Os pesquisadores sugerem que o perfil glicolítico exacerbado está relacionado com a alta expressão de HIF1 α e essa expressão metabólica e gênica que induz um perfil mais glicolítico contribui para a maior malignidade da doença (57).

Sirtuínas:

Muitos mecanismos moleculares estão relacionados com a reprogramação metabólica e a maior captação de glicose pelo tumor, de modo que uma das possíveis causas desse fenômeno é a alteração na expressão de proteínas que agem como reguladores metabólicos, tais como as sirtuínas.

Sirtuínas é o nome dado a uma família de enzimas dependente de NAD⁺, que estão relacionados com diversos processos biológicos (71). Estas foram descobertas em organismos simples (*C. elegans* e *drosophilas*) como fatores de silenciamento por agirem como histonas deacetilases, além de serem responsáveis por evitar danos no DNA uma vez que deacetilam histonas, haja visto que o aumento da acetilação ou a falta de deacetilação leva à instabilidade genômica e a danos no DNA (71). Existem sete homólogos dessas proteínas em mamíferos, tendo uma relação evolutiva. Essas proteínas estão relacionadas com resistência ao estresse celular, estabilidade genômica, metabolismo energético, envelhecimento e tumorigênese (11). Cada isoforma tem uma função e um compartimento celular específico.

As sirtuínas 1, 6 e 7 (SIRT1, SIRT6 e SIRT7, respectivamente) estão localizados no núcleo, onde apresentam uma função canônica e deacetilases de histonas, dessa forma elas agem influenciando a expressão gênica de modo epigenético (71–73). As sirtuínas 3, 4 e 5 (SIRT3, SIRT4 e SIRT5, respectivamente) estão localizadas nas mitocôndrias, onde agem com deacetilases na mitocôndria, essas proteínas apresentam papel proeminentes no controle do metabolismo mitocondrial (OXPHOS e ciclo do ácido cítrico) e na regulação da produção de radicais livres. Estas proteínas também estão relacionadas com o controle do estresse mitocondrial (71–73). Evidências sugerem que as sirtuínas estejam relacionadas com a inibição da carcinogênese em diferentes tipos de câncer. As sirtuínas também são relacionadas com o controle metabólico de diversas células, no câncer essas proteínas estão relacionada com a inibição da reprogramação metabólica e da proliferação (9,46,74,75).

SIRT1 está relacionada com o controle do metabolismo muscular esquelético e hepático. Essa proteína inibe a expressão de Fosfoglicerato mutase 1 (PGAM1) e dessa forma inibi a glicólise e aumenta a oxidação de ácidos graxos. No câncer de cólon (APC^{+/+} - *adenomatous polyposis coli*) há indícios que a superexpressão de SIRT1 suprime o crescimento tumoral e esses resultados se correlacionam com a menor expressão de PGAM (8) .

SIRT3 e SIRT6 reprimem a glicólise, SIRT4 regula o uso de carbono dos aminoácidos reprimindo a retirada de grupamentos amino do glutamato (76). Em estudos sobre o metabolismo celular no câncer há indícios que estas proteínas reprimem o efeito Warburg; a inibição de SIRT3 e SIRT6 em tumores leva a desregulação da glicólise; a inibição de SIRT4 leva a glutaminólise. O comportamento disfuncional da glicólise e da glutaminólise estão diretamente ligados com a reprogramação metabólica em células cancerosas e contribuem para a malignidade do câncer (76).

SIRT6 apresenta um papel particular na regulação do metabolismo e no reparo do DNA (11); animais *knockout* para SIRT6 apresentam perda total de gordura subcutânea, linfopenia,

osteopenia e morte prematura, além de apresentarem severa hipoglicemia sem ocorrer aumento concomitante da insulina (10,11).

Corroborando com os dados encontrados em animais, células embrionárias e fibroblastos com deficiência de SIRT6 apresentam grande consumo de glicose. Associado a esse fenômeno ocorre uma superexpressão de GLUT1 nessas células, o que é uma das principais causas desse excessivo consumo de glicose (11). O comportamento das células deficientes em SIRT6 é condizente a uma condição de escassez de glicose ou estresse nutricional, dessa forma SIRT6 age como um sensor da captação de nutrientes no meio celular (11).

O principal motivo pelo qual a ausência de SIRT6 ocasiona essas alterações metabólicas é que essa proteína age como um silenciador de genes da via glicolítica, tais como LDH α , GLUT1, PFK-1 e PDK (11). O mecanismo para tal fenômeno é que SIRT6 causa a deacetilação da histona H3K9 gerando o silenciamento dos genes citados. Animais *knockout* para SIRT6 apresentam maior acetilação da histona H3K9 e também o aumento de genes da via glicolítica (11,77,78). Além disso existe um balanço entre SIRT6 e o HIF1 α (10). Quando SIRT6 está diminuída, HIF1 α está aumentado. Pelo fato de SIRT6 deacetilar a histona H3K9 ocorre também a inibição da tradução de HIF1 α além das outras proteínas da via glicolítica já citadas. A importância desse processo é que HIF1 α age promovendo o aumento de genes da via glicolítica e está relacionado com o escape das vias oxidativas mesmo na presença de glicose (10). SIRT6 ainda está relacionada com o metabolismo ribossomal, pois controla a expressão de C-MYC, que por sua vez tem o papel de reguladora da ribossomogênese e controla o crescimento tumoral (10). A literatura aponta que SIRT6 tem a expressão diminuída em alguns tumores humanos, mas principalmente no câncer de colorretal e esse fenômeno está relacionado com o aumento da mortalidade (10).

É sabido que alterações metabólicas podem facilitar a tumorigênese, pois a reprogramação metabólica é um ponto chave para ativação de oncogenes e inativação de supressores tumorais (9); apoiado nesse contexto muitos estudos têm sido desenvolvidos para investigar o papel da SIRT6. Sebastián e seus colaboradores fizeram a ablação total de SIRT6 em fibroblastos embrionários e inocularam essas células em camundongos imunodeficientes, esse procedimento por si era capaz de gerar tumores nos animais. Entretanto, o mesmo procedimento em camundongos imunocompetentes não gerava tumores espontaneamente, apenas após injeção de oncogenes (9). Muito embora, animais imunodeficientes ou imunocompetentes que foram inoculados com as células com deleção de SIRT6 (fibroblastos embrionários) apresentaram maior número de tumores, além desses tumores terem maior tamanho e agressividade (9).

As células de fibroblasto embrionários com deleção de SIRT6 apresentavam alta produção de lactato e aumento da captação de glicose, além do fato dessas células morrerem quando submetidas a jejum de glicose. Entretanto a recuperação da expressão de SIRT6 nestas células diminui o consumo de glicose e produção de lactato e a inoculação dessas células em animais leva à uma menor formação de tumores (9). O aumento de lactato no tumor está associado à inibição de células *natural killers* (NK) e linfócitos T, sendo dessa forma um mau prognóstico (79).

Esses dados citados apontam que o metabolismo das células cancerosas tem um grande peso na tumorigênese e progressão tumoral; e SIRT6 apresenta um papel fundamental nesses processos. Sebástian e seus colaboradores ainda mostraram que células com deficiência de SIRT6, somada ao silenciamento de PDK1, quando inoculadas em animais apresentam um menor crescimento tumoral comparado com animais sem o silenciamento de PDK1. Esse dado mostra o grande papel do metabolismo glicolítico na progressão tumoral. Além da progressão tumoral ocorrer mesmo na ausência de oncogenes, mostrando independência do metabolismo nesse processo (9).

Fatores induzidos por hipóxia (HIFs):

Fatores induzidos por hipóxia (HIFs) são fatores de transcrição que respondem a diminuições no oxigênio disponível no ambiente celular (hipóxia) (12,80). HIFs são expressos nas células de modo contínuo; em condição de normóxia os HIFs são ubiquitinados pela ação ubiquitina ligase VHL e levados para degradação pelo proteassoma (12,80). Entretanto em condição de hipóxia esse mecanismo é inibido, uma vez que VHL utiliza oxigênio como substrato para a reação de ubiquitinação, promovendo aumento da expressão de HIFs nas células (12,80).

Existem diversas isoformas de HIFs, entretanto uma das isoformas mais estudadas é HIF1 α . Em células normais em condição de hipóxia, HIF1 α promove a sobrevivência celular regulando a expressão de diversos genes. HIF1 α regula principalmente a expressão de enzimas da via glicolítica, promovendo o aumento da expressão dessas enzimas e dessa forma possibilitando aumento da glicólise para manter o fornecimento de ATP para célula (81).

Sabe-se que nos tumores as áreas de hipóxia são vastas e comuns (2,15). Isso se dá pois os vasos sanguíneos tumorais são estruturalmente e funcionalmente anormais, resultando em regiões intratumorais heterogêneas sem aporte de oxigênio (15). A hipóxia promove nos tumores um fenótipo agressivo e impede a eficácia de terapias antineoplásica sistêmica, uma vez que os fármacos não conseguem acessar o tumor (15).

A expressão de HIF1 α é comumente aumentada em diversos tipos de câncer como uma resposta a hipóxia, muito embora há evidências de uma expressão de HIF1 α constitutivamente

aumentada em tumores mesmo em normóxia (82–84). Esse fenômeno contribui para a ativação da transcrição de genes que estão envolvidos em aspectos cruciais da biologia do câncer, incluindo alteração no metabolismo celular, angiogênese, sobrevivência celular e metástase (84). Dessa forma, a alta expressão de HIF1 α tem sido associada ao aumento da mortalidade de pacientes em vários tipos de câncer (84).

Sabe-se que uma das principais complicações do câncer de mama é a lesão metastática no cérebro; O estudo de Ebright e colaboradores colocou em cultura células tumorais circulantes (CTC) derivadas de amostras de sangue de mulheres com câncer de mama avançado, essas células foram inoculadas no lobo frontal do camundongo e exibiram uma diferença marcantes no potencial proliferativo comparado com o controle (85). O aumento da proliferação estava associada com a superexpressão de HIF1 α (85). As CTC foram tratadas com inibidores de HIF1 α , foi observado menor crescimento tumoral (85). Em amostras de tumores humanos originados de metástase no cérebro observa-se maior expressão de HIF1 α comparado com o tumor primário mamário (85).

MicroRNA e sirtuínas;

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam a expressão de proteínas, através do controle posterior a transcrição de RNA mensageiro (mRNA). Os microRNAs apresentam uma fita curta de aproximadamente 17 a 22 nucleotídeos na sua forma madura. Os microRNAs maduros se ligam ao mRNA e reprimem a tradução dos mesmo em proteínas (16,86,87). Os microRNAs controlam diversos processos tanto fisiológicos como patológicos; há evidências que ao menos um terço de todas as vias biológicas sofrem controle por microRNAs (88,89).

Lee e colaboradores foram os primeiros a descreverem essas moléculas em 1993. Os pesquisadores estudaram o papel de uma pequena molécula de RNA de nome Lin-4 no desenvolvimento larval de *C elegans*, dessa forma Lin-4 foi o primeiro microRNA estudado (86).

No ano 2000, o mesmo grupo de pesquisa observou que o microRNA lin-4 participava do controle pós-transcricional da proteína lin-14 (16), através da ligação complementar do microRNA com a região 3'UTR do mRNA da proteína. Outros estudos foram desenvolvidos para testar a hipótese de que pequenos RNAs poderiam participar dos controles pós-transcricionais, quando, portanto, foi descoberto o microRNA let-7, que apresenta uma ligação parcialmente complementar com a região 3'UTR do mRNA da proteína lin-41 e também exerce controle negativo sobre a expressão proteica (16). Esses achados possibilitaram descobertas de novos microRNAs e atualmente são conhecidas mais de 30.000 sequências de microRNAs maduros nos mais diferentes organismos (88,89).

Dessa forma, ficou conhecido que os microRNAs se ligam na região 3'UTR do mRNA alvo. Essa ligação pode ser com complementariedade total ou parcial, em caso de total complementariedade ocorre degradação do mRNA (fenômeno comumente observado em plantas), se a complementariedade for parcial o mRNA tem a tradução inibida (fenômeno comum em mamíferos) (88,89). Os microRNAs se ligam a uma região do mRNA denominada *seed* presente na região 3'UTR onde pode ocorrer uma paridade total ou apenas alguns dos pares de base são complementares, mas o bastante para haver ligação. Devido a essa possibilidade de pareamento imperfeito e o pequeno tamanho dessas moléculas observa-se que um microRNA apresenta diversos mRNAs alvos (88,89).

A biogênese canônica dos microRNAs inicia-se com a ação da enzima RNA polimerase II ligando-se em regiões promotoras e gerando um transcrito denominado pri-microRNA. Esse transcrito apresenta uma estrutura de dupla hélice do tipo grampo e aproximadamente 300 nucleotídeos; ainda no núcleo celular a enzima *Drosha* cliva este pri-microRNA formando uma nova molécula precursora do microRNA, de nome pré-microRNA. O pré-microRNA é exportado para o citoplasma pela enzima exportina 5, no citoplasma o pré-microRNA é clivado pela enzima *Dicer*, esse processo dá origem a um duplex de RNA, ou seja, duas fitas em conjunto, uma delas é o microRNA maduro e a outra é denominada de fita anti-sense. O microRNA maduro é então incorporado por um complexo multimérico de nome RISC (*RNA induced silencer complex*) (88,89). Um diagrama esquemático pode ser encontrado na figura 5.

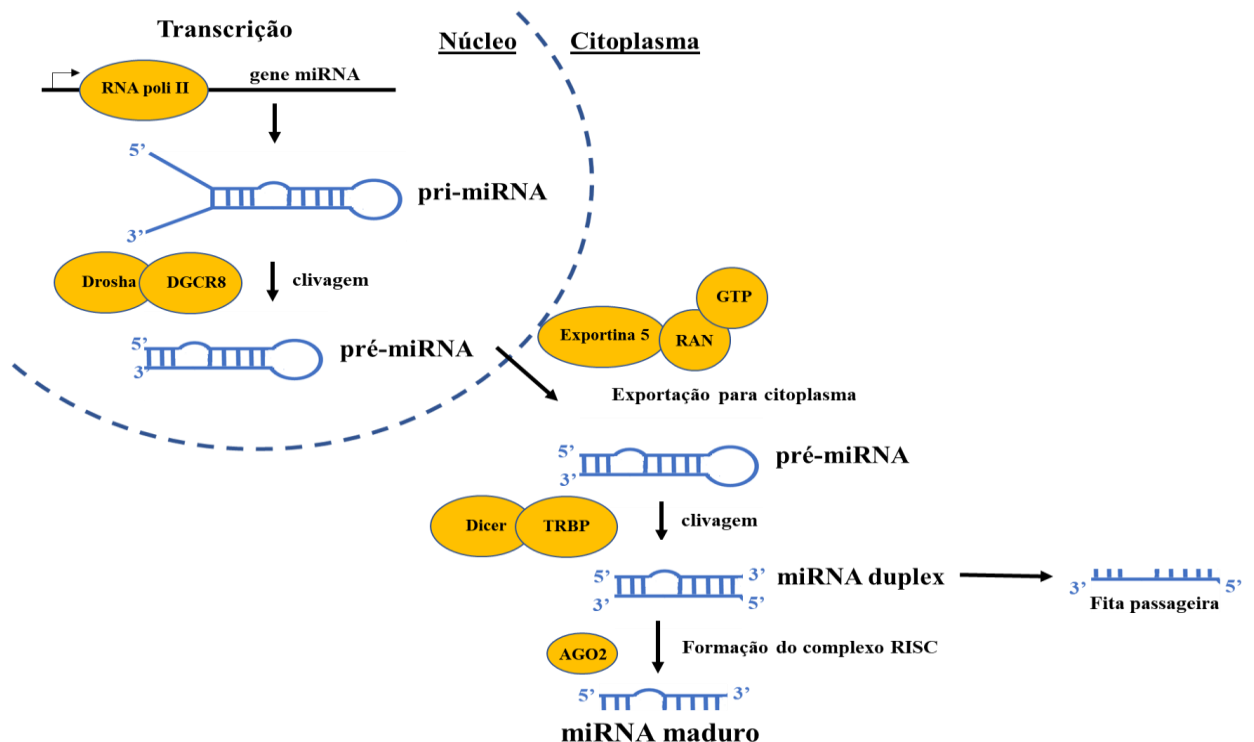


Figura 5: Figura esquemática da biogênese dos microRNAs adaptada de Winter 2009 (90).

Várias estratégias são aplicadas pelas células para interferir ou facilitar cada etapa do processo de biogênese dos microRNAs, incluindo o recrutamento de fatores de transcrição, proteínas ligantes de RNA, enzimas modificadoras de proteína e enzimas modificadoras de RNA (88,89). Durante a progressão tumoral o processamento dos microRNAs também é finamente regulado, por exemplo, cofatores como SMAD e p53, demonstram estar associados ao complexo Drosha controlando o processamento de subconjuntos específicos de microRNAs que atuam como reguladores da proliferação de células tumorais (52). HIF1 α , também, é conhecido como um fator que regula a expressão de microRNAs em tumores (91). Hu e colaboradores demonstraram que células iniciadoras de glioblastoma (GICs) há um aumento da expressão da proteína HIF1 α , essa proteína interage com o sistema Drosha e promove o aumento da expressão do microRNA-215. Este microRNA por sua vez alveja o mRNA que codifica a proteína KDM1B que tem a função nesse tipo de células de inibir o metabolismo glicolítico e promover angiogênese (91).

Os microRNAs também exercem controle sobre as vias metabólicas; os microRNAs 33a-3p e 33b-3p foram descritos como reguladores do metabolismo de ácidos graxos e na sinalização da via da insulina (24). Estes microRNAs fazem parte de uma família amplamente conservada dentro de sequências intrônicas dos genes SREBP em organismos que variam de *drosophila* a humanos. Em camundongos, no entanto, existe apenas um gene dessa família e ela codifica o microRNA-33a (24). Os alvos validados do microRNA-33a-3p são prioritariamente genes que tem grande influência no metabolismo oxidativo, sendo eles a enzima carnitina palmitoil transferase, proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e SIRT6 (24). Em casos de desbalanços no metabolismo em decorrência de processos patológicos, tais como diabetes e síndrome metabólica, ocorre o aumento da expressão do microRNA-33a-3p resultando na diminuição da oxidação de gorduras e glicose e também menor atividade da sinalização de insulina (24).

Na literatura científica existe divergências sobre o papel da família do microRNA-33 no câncer, principalmente sobre o papel do micrRNA-33a. A super expressão do microRNA 33a-5p foi demonstrada como uma possível forma de inibição da proliferação celular por controle do metabolismo de glicose (92). Entretanto, apesar de não haver estudos sobre o metabolismo tumoral e a relação com a expressão do microRNA 33a-3p (que alveja SIRT6), estudos tem mostrado que há a superexpressão desse microRNA em diferentes tipos de câncer e que esse fenômeno está relacionado com a maior proliferação das células tumorais (93,94)

Apesar dessa divergência do papel da família do microRNA 33, se faz importante investigar o papel dos seus membros no câncer, uma vez que os microRNAs tem grande influência da malignidade dessa doença e, inclusive, tem grande participação nos processos citados como *hallmarks* do câncer (2) e, também, o fenótipo do câncer pode ser modificado

através da expressão de microRNAs (95). Baseado nessa observação existe um esforço da comunidade científica em compreender melhor os mecanismos envolvendo microRNA e câncer, que por sua vez são extremamente intrincados, para desenvolver terapias gênicas específicas (96). Os objetivos dessas terapias são promover melhores respostas as drogas convencionais para o tratamento da doença e reprimir de modo específico processos oncogênicos agindo como um tratamento e melhorando o prognóstico da doença. Estudos apontam que o exercício físico é capaz de alterar a expressão de diversos microRNAs tanto teciduais como circulantes.

O trabalho de Baggish e colaboradores mostra que o exercício é capaz de aumentar a expressão de diversos microRNAs circulantes, que estão envolvidos com a diminuição de fatores inflamatórios, como os microRNAs-21 e miR-146a, e microRNAs que estão envolvidos com o trofismo e a contratilidade muscular cardíaca e muscular esquelética, como o microRNAs-133a (97). Mooren e colaboradores também apontam que o exercício físico altera a expressão dos microRNAs na circulação, e alguns microRNAs, como o -206, -1 e o -21, podem ser utilizados como biomarcadores do treinamento aeróbico (98).

Muitos trabalhos na literatura mostram, também, que o exercício físico tem a capacidade de controlar a expressão de diversos microRNAs que estão descompensados por doenças como hipertensão, diabetes e obesidade. Os estudos mostram que essas patologias causam alterações moleculares e estruturais e o exercício é um estímulo positivo para a reversão e o controle dessas alterações deletérias como diminuição da massa muscular e rarefação microvascular. Portanto, o exercício físico regula a expressão de microRNAs envolvidos com essas mudanças negativas e restaura o tecido ou previne a deterioração acentuada (99).

Poucos são os trabalhos que investigam o papel dos microRNAs relacionados com câncer e o exercício físico; não há trabalhos que descrevam a expressão do microRNA-33a-3p e a sua relação com o exercício físico.

5. Material e métodos

5.1 Manejo animal

Modelo animal: Utilizou-se 80 camundongos balb/c fêmeas provenientes do biotério da EEFÉ-USP, os animais foram mantidos em caixas com até 5 camundongos com água e ração a vontade. A divisão dos grupos ocorreu de forma aleatória, sendo os grupos: i) câncer sedentário (SED+CT26), ii) câncer treinado (TR+CT26), iii) câncer treinado quatro semanas antes do inóculo das células tumorais (TR4+CT26), iv) câncer treinado oito semanas antes do inóculo das células tumorais (TR8+CT26) e v) controle saudável sedentário (WT). Diariamente os animais foram pesados e o volume tumoral foi medido com paquímetro. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da EEFÉ-USP, e está registrado com o número 2018/02.

Protocolo treinamento: O protocolo de treinamento em sistema de esteira rolante foi adaptado de Ferreira *et.al.*, 2007 (97). O treinamento teve duração variada entre os grupos como descrito abaixo, porém todos os grupos treinados realizaram 5 sessões semanais com aumento progressivo do tempo, atingindo 60 minutos consecutivos depois de 3 sessões de treinamento. Também, houve aumento progressivo de sobrecarga de trabalho, chegando a 60% da velocidade de exaustão. A sobrecarga de trabalho foi obtida por meio de teste de exaustão, que corresponde a intensidade de máxima fase estável de lactato. Esse trabalho é caracterizado como de moderada intensidade com predomínio de metabolismo aeróbio.

Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo e protocolo de treinamento: Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante. A velocidade inicial foi de 3m/min (sem inclinação), que constituiu um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3 min até ser atingida a velocidade máxima suportada por cada animal (97).

Avaliação do crescimento tumoral: o crescimento tumoral foi avaliado diariamente após a injeção das células tumorais utilizando paquímetro. Foram mensurados o maior e o menor diâmetro do tumor de acordo com o descrito por Bergers *et al.*, 2003 (98). Os valores obtidos foram utilizados na fórmula a seguir para a estimativa do volume tumoral: $V = 0,52 \times (\text{maior diâmetro}) \times (\text{menor diâmetro})^2$.

Medidas metabólicas (gaiola metabólica): Para avaliar o consumo de água e ração e a excreção de fezes, os animais foram colocados em um sistema de gaiolas individuais capaz de separar os excrementos dos animais e preservar a ração e água separados. O volume de água foi padronizado em 50ml e a quantidade de ração em 5g, para cada gaiola. Os animais foram posicionados na gaiola e permaneceram por 24 horas, e ao final do protocolo pesou-se as fezes, a ração restante e foi medido o volume de água remanescente. Os valores padrões de água e ração eram subtraídos dos valores remanescentes para obtenção dos resultados. Este protocolo foi repetido 3 vezes com intervalos de uma semana.

Retirada de tecidos: a eutanásia dos animais seguiu princípios éticos. Os tecidos retirados e pesados foram músculo esquelético (sóleo, gastrocnemios e tibial anterior), coração, fígado, baço, pulmão, gordura branca e marrom, tumor e baço. Para evitar variações nos resultados em decorrência da variabilidade do tamanho e massa dos animais, a massa dos tecidos foi corrigida pelo comprimento da tíbia (medida por paquímetro e expressa em mm), dessa forma há uma razão entre a massa de cada tecido de cada animal com comprimento da tíbia, expressa em g/mm.

5.2 Cultura celular

Células tumorais do câncer de cólon CT26 (ATCC® CRL-2638™) foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Cultilab #1618), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Com 80% de confluências as células foram contadas e 1.10⁵ injetadas no flanco superior direito dos animais.

Cultural primária: 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 (Cultilab #1618), suplementado com 10% de FBS 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 puromicina para a seleção de uma população de células tumorais CT26, uma vez que essas apresentam cassete de resistência para puromicina. Após, as células foram injetadas nos animais com a concentração de 1.10⁵.

Seahorse: Análises metabólicas funcionais em células primárias CT26 foram realizadas usando um analisador *Seahorse* XFe96 (*Seahorse* Bioscience) de acordo com o protocolo do fabricante. Células Primárias (40.000 por poço) foram cultivadas em microplacas XFe96. Após 12 horas, o meio celular foi mudado para um meio de ensaio não tamponado e as células foram mantidas num incubador sem CO₂ durante 1 hora. Usando o *Mito Stress Test Kit*, foram avaliados OCR (Taxa de consumo de oxigênio) e ECAR (Taxa de acidificação extracelular) sob condições basais, seguindo injeções sequenciais de oligomicina (1.5 µM), o desacoplador mitocondrial Carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP; 1.5 µM) e uma mistura dos inibidores da cadeia respiratória, antimicina A (1.5 µM) e rotenona (1.5 µM). A análise dos dados foi realizada por meio do *software Seahorse Wave Desktop* (Agilent Technologies, obtido gratuitamente no sitio <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/wave-desktop-2-6>).

Os dados são expressos após correções matemáticas. A respiração mitocondrial equivale aos valores basais de respiração subtraídos dos valores após aplicação de rotenona. A respiração não mitocondrial é equivalente aos valores após aplicação de rotenona. *APT link* equivale a valores basais subtraídos de valores após aplicação de oligomicina. A respiração total refere-se a valores após a aplicação de FCCP. *Pronton leak* equivale a subtração dos valores de oligomicina e rotenona.

Respirômetro de alta resolução: Foi utilizado um respirômetro de alta resolução (*O2k-System – Oroboros Instrument*) para detecção de mudanças na concentração de oxigênio de células primárias oriundas de tumores. O equipamento consiste em duas câmaras fechadas onde foram

depositadas células primárias para as análises. A concentração de oxigênio foi medida em condição basal, seguindo injeções sequenciais de oligomicina (1,5 μM), o desacoplador mitocondrial Carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP; 1,5 μM) e uma mistura dos inibidores da cadeia respiração antimicina A (1,5 μM) e rotenona (1,5 μM). A análise dos dados foi feita por meio do *software Origin* (<https://www.originlab.com/>). Como houve variação na quantidade de células obtidas, os valores obtidos foram normalizados pelo número de células. Os valores são expressos em unidade arbitraria. As correções matemáticas usadas no *seahorse* foram adotadas nos dados do respirômetro de alta resolução.

5.3 Atividades enzimáticas

Atividade da enzima citrato sintase: Os tumores (20 μg) foram homogeneizados a 4°C em tampão de extração contendo NaCl (1 M), Triton (1%), Tris (50 mM) e SDS (0,1%). As amostras foram centrifugadas a 4°C, 3.000g durante 15 minutos; o sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. A quantificação da proteína no homogeneizado foi realizada segundo o método de Bradford *et al.* 1976 [59]. A atividade máxima da enzima foi determinada a partir de quantificação do complexo amarelado formado entre a coenzima A com o ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), segundo método de Alp & Newsholme [60]. Para tal, foi preparado tampão de ensaio composto Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v). Em placas de 96 poços transparentes e de fundo chato foi adicionado o tampão e o homogeneizado. Para iniciar a reação foi adicionado oxaloacetato (18,9 mM) ao meio. Foi realizado registro da cinética enzimática a cada 30 segundos em cada poço e foram realizadas 20 leituras por poço, em 412nm no equipamento Victor (Victor3 1420 Multilabel Counter/ PerkinElmer, MA, USA). O resultado da atividade da enzima está expresso em valores de nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

Quantificação de glicose-6-fosfato: para quantificação desse produto da via glicolítica nos tumores foi usado o *kit Glucose-6-Phosphate Assay* (#MAK014, Sigma Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. O fabricante descreve o *kit* como um meio simples, sensível e rápido de quantificar glicose-6-fosfato em uma variedade de amostras. O ensaio determina a quantidade de glicose-6-fosfato após um ensaio enzimático, que resulta em um produto colorimétrico quantificado na absorvância de 450 nm.

Quantificação de frutose-6-fosfato: Para quantificação desse produto da via glicolítica nos tumores foi usado o *kit Fructose-6-Phosphate Assay* (#MAK020, Sigma Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. De acordo com a descrição do fabricante o método é altamente sensível e simples, baseado em fluorescência para quantificar frutose-6-fosfato em grande variedade de amostras. A concentração de frutose-6-fosfato é determinada por uma reação enzimática, que resulta em um produto fluorométrico quantificado na absorvância de 535~587 nm.

Quantificação de lactato: Para quantificação de lactato nos tumores foi usado o *kit Lactate Assay Kit II* (#MAK065, Sigma Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. O Kit possibilita determinar a quantidade de lactato após um ensaio enzimático, que resulta em um produto colorimétrico quantificado na absorvância de 450 nm.

5.4 Expressão proteica

As amostras de tumores foram processadas para essa técnica com o mesmo homogeneizado proteico descrito na técnica de atividade de citrato sintase, assim como a quantificação de proteínas seguiu o mesmo protocolo já descrito. Ao homogeneizado foi adicionado tampão *laemmli* (4% SDS, 10% beta-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,1% Tris pH 6,8 e 0,005% bromofenol azul), a concentração de proteína no homogeneizado foi ajustada em 3 µg/µl para cada amostra. Foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE), que consiste na migração de proteínas em malha de gel de poliacrilamida por meio de atração de cargas elétricas opostas entre as proteínas do homogeneizado e o campo elétrico promovido pelo aparelho minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). As proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, também por diferença de carga do campo elétrico promovida pelo aparelho minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). As membranas de nitrocelulose com proteínas foram incubadas por 12 horas em solução contendo albumina e o anticorpo primário responsável pela detecção da proteína de interesse formando um complexo anticorpo-proteína. Foram usados os anticorpos que detectam as proteínas SIRT6 (*Thermo Fisher Scientific* # MA524768), HIF1α (*Abcan* #154478), MAPK3 (*Abcam*, # ab17942), pMAPK3 (*Abcam*, # ab214362), PI3K (*Cell Signaling Technology* #4249), AKT (*Cell Signaling Technology* #9272), p44/42 MAPK (*Cell Signaling Technology* #4695), BAD (*Cell Signaling Technology* #9292) e *OxPhos Rodent WB Antibody Cocktail* (*Thermo Fisher Scientific* #45-8099). Depois desse processo as membranas foram incubadas por duas horas em solução de albumina e anticorpo secundário, direcionado a porção espécies-específicas do anticorpo primário. Foram utilizados os anticorpos IgG IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (Li-Cor #AB_2687825) e IgG IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (Li-Cor #AB_2651127). O complexo proteína-anticorpo primário-anticorpo secundário foi detectado mediante reação de fluorescência (Odissey, Li-Cor, USA) e os *blots* foram visualizados e quantificados pelo sistema ImageJ (NIH, fornecido gratuitamente no *site* <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Imagens obtidas após o tratamento com *ponceau* foram usadas como normalizador.

5.5 Expressão gênica

A expressão dos microRNAs e mRNAs foi analisada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (real-time PCR). Foram usadas 15 mg de amostra de tumor e 200.000 células

primárias para extração RNA. As amostras foram homogeneizadas em Trizol (700µl), e o RNA foi isolado segundo às instruções do fabricante (Invitrogen Life Technologies, Strathclyde, UK). Brevemente, há adição de clorofórmio (200 µl) no homogeneizado, formando uma solução trifásica após centrifugação (12.000 RPM – 15 minutos). O sobrenadante foi recuperado dessa solução, o próximo passo foi adicionar isopropanol levando a condensação do RNA, o RNA se deposita em *pellet* após centrifugação (12.000 RPM – 10 minutos). O *pellet* foi lavado em etanol 75%, logo após o etanol foi descartado e o RNA foi eluído em água DEPC (água ultra pura tratada com 0,1 % dietilpirocarbonato).

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria em Nanodrop, na razão 260/280 nm e verificada à integridade do RNA total em gel de agarose 1% em condições denaturante com 1-2 µg de RNA total. O cDNA para análise de microRNAs foi sintetizado a partir do RNA total utilizando *primers* específicos para cada microRNA e mRNAs analisados de acordo com os protocolos *TaqMan microRNA Assay* (Applied Biosystems, CA, USA) e Power SYBR Green (Applied Biosystems, CA, USA), respectivamente.

Para confecção do cDNA dos microRNAs foram utilizados 10 ng de RNA. Foi preparada uma solução de trabalho composta por dNTPs 100mM, multiscribe reverse transcriptase 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml, *primer* RT e água DEPC, à essa solução foi adicionado 10ng de RNA total. A solução de trabalho somada à amostra foi levada ao termociclador (Applied Biosystems, CA, USA) e passou pelo seguinte ensaio para reação de PCR 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e após as amostras foram mantidas a 4°C. Após a confecção do cDNA foi realizada a reação de RT-PCR para determinar a expressão de microRNAs. Foi realizado uma solução de trabalho composta por TaqMan 2X Universal PCR master mix II (No AmpErase UNG) *primer* TM (*TaqMan microRNA Assay 20X*) e água DEPC, foi adicionado nessa solução o cDNA. 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.

A reação de PCR para determinação de expressão gênica de mRNAs foi semelhante ao protocolo para microRNAs. Entretanto, foi utilizado 1000ng de RNA total para confecção do cDNA, a solução de trabalho foi composta por dNTPs 100mM, *multiscribe reverse transcriptase* 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml e água DEPC. A solução de trabalho somada à amostra foi levada ao termociclador (Applied Biosystems, CA, USA) e passou pelo seguinte ensaio para reação de PCR 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e após as amostras foram mantidas a 4°C. Para a reação de RT-PCR a solução de trabalho foi composta por *Power SYBR Green* (Applied Biosystems, CA, USA), *Primers*

confeccionados (Invitrogen) e água DEPC, as amostras foram incubadas a 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Avaliou-se a expressão de 4 normalizadores ORR1 (definir), ciclofilina, 18s e ACTB (definir), pelo algoritmo *DataAssist* (*DataAssist™ Software – Thermo Fisher Scientific - USA*), a melhor resposta foi do gene ORR1.

Todos os microRNAs foram comprados na empresa Thermofisher. O código dos microRNAs e a sequência da confecção dos *primers* de mRNAs são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Código dos microRNAs e sequências de pares de bases de mRNA usados no trabalho.

MicroRNA	Código	
mmu-miR-33a-3p	A25576	
hsa-miR-23a-3p	000399	
hsa-miR-24-3p	000402	
mmu-miR-470-5p	002588	
mmu-miR-299a-3p	002612	
mmu-miR-135a-2-3p	462760_mat	
mmu-miR-410-5p	464693_mat	
mmu-miR-181d-3p	464277_mat	
mmu-miR-16-2-3p	462713_mat	
mmu-miR-29b-2-5p	002166	
mmu-miR-467g	002811	
Gene	sequência Forward	Sequência Reverse
ACO1	TTGGGGTGTGGGTGGTATTG	CTTGTCGGAGGTGCTTGGTA
AKT2	TGGCTGGAAAAGGCGGTATT	GCTCGTTCCTCGCTCCTTATT
ANGPT1	TGCTAAAGGGAGGAAAAAGAGA	TACTGTCCAACCTCCCCCAT
BCL2	GAAGTGGGGGAGGATTGTGG	GCATGCTGGGGCCATATAGT
CAM2d	AGGGACCTGAAGCCTGAGAA	GTGCCAGCAAACCAAACCA
c-Myc	TTCGCATGCAGCACCTGATTG	TTCTGTGGGGTTCGCTGGTAA
CS	CCTTTC AACCTTGTCGCGCCG	AGGCAGGATGAGTTCCTGGCTC
ELOC	TTTTACTGCCACAACGCA	ACGACCACGACGACCACTA
FH1	TACGGAACGTATGCCAATCCC	CAGTCTGCCAAACCACCAGA
GLUT1	GGCCTAAGGTCACATGAAGAAGG	CCTCCCACAGCCAAACATGAG
HIF1 α	ATGGCCCAGTGAGAAAAGGG	AGTGAAGCACCTTCCACGTT
HK1	CTGAAGGATGACCAAGTCAAAAAGA	AAATCCCCCTTTTCTGACCCGT
IDH1	GAGGAGACAAAGCCGGGAAG	CTTCAATAACCCGGCTCACAC
IDH2	CCAGGAGATCTTTGACAAGCACTA	ATGTCATCAGGCCGAGGGAG
IGF1R	GCTCATTCAATTTCCACTCCGC	AGAAAGAGGAGCAAAGCCCAA
INSR	GATGTCCCATCAAATATTGCCAAA	CGGCACGTACACAGAAGATG
LDHa	TCGTGCACTAGCGGTCTCAA	CAGCTGGTCCTTGAGGGTTG
MDH1	TTTGGGAAAGACCAGCCATC	CAGTTCATCAGGACACCGT
MDH2	CCGCCTGACCCTCTACGATA	TCCCGTGTCAATCCTGGTTT
OGDH	CTGATCTGGACTCCTCCGTG	TGTAGGCCATAGAACCCTCC
Orr1	GGTTGGAATGGGTGTGTAC	TGGCTTACAGGTTTACAGAGT
PDH1	GCTCAACAAGTATGTCAGAGGC	GAGTGTCTGTCCTTGCTTCCA
PDK1	TGCGAAATCACCAGGACAGA	TCGCTCTCATGGCATTCTTGA
PFK1	GGAGAGCTAAAACTACAAGAGTGGA	TGACGGCAGCATTTCATACCT
PFKfb3	TTGGGGCCTTTCAATGTGTG	CGAGTCCCAGGAGGTGTATC
PiK3CA	TCCTCAGCTCTCACCTCCT	GGTCTCTTTCCGCTCACAT
PIK3R1	TAAATGGTGAGCACGGAGATG	ACACACCCAGCCAATCAA
PKM1	AGTGTTTAGCAGCAGCTTTGA	TGAGCACTCCTGCCAGACT
PKM2	TTCGCATGCAGCACCTGATTG	TTCTGTGGGGTTCGCTGGTAA
RPS6kb1	TTACCTAGCGCCTGACTTCC	CCCCCTCCTCCAGCTC
SDHa	TGCGGCTTTCCTTCTCTGT	GAAAGGCCAAATGCAGCTCG
SIRT1	GGCTACCGAGGTCCATATACTT	AGCTCAGGTGGAGGAATTGT
SIRT3	TCAAAGCTGGTTGAAGCCCA	ACATCAGCCCATATGTCTTCCC
SIRT6	GGTGACACGGAGGAACCTG	TCCCTGACCTGACGATTG

5.6 Análises histológicas

Os tumores foram conservados em formol por 24 horas, depois colocados em banho de álcool 70%, em seguida foram feitos blocos de parafina para conservação e corte. Os cortes histológicos foram de 10 µm de espessura. Para todas as análises os tecidos foram desparafinizados em banho de xilol e álcool.

Imuno-histoquímica: Utilizou-se a técnica de imunoperoxidase indireta. Os tecidos foram desparafinados em xilol por 30 minutos, hidratados em banhos de álcool com concentração decrescente. Em seguida foi utilizado uma solução de bloqueio com soro fetal bovino a 10%. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário HIF1α (Abcam #154478) e SIRT6 (*Thermo Fisher Scientific* #MA524768) por uma hora em temperatura ambiente. Após foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com metanol e 3% de água oxigenada por 5 minutos. Foi incubado o anticorpo secundário por 45 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram marcadas com diaminobenzidina (dab). Todas as amostras foram contra-coradas com hematoxilina. A captura das imagens foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (*Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha*). As análises foram feitas usando o software *imageJ* (NIH, fornecido gratuitamente no sítio <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Kits de coloração: Foram utilizados os kits de coloração para Hematoxilina & Eosina (*Bioquochem KH07004*) e *Picro-Sirius Red Solution* (ab246832) seguindo as instruções do fabricante. A captura das imagens foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (*Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha*). As análises foram feitas usando o software *imageJ* (NIH, fornecido gratuitamente no sítio <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Oil Red: Para marcação do conteúdo de lipídios as lâminas foram lavadas em água deionizada na sequência e coradas com a solução de trabalho *Oil Red* (*Oil Red O #09755 Merck*) adicionado a 100 ml de Trietilfosfato aquoso a 60% e 8 ml de água deionizada por uma hora. Na sequência, as lâminas foram lavadas novamente e fixadas com 10% de glicerol em PBS. Nessa técnica a solução de trabalho se liga ao conteúdo de gordura causando uma coloração avermelhada na presença de lipídeos. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (*Leica*

Qwin, Leica Microsystems, Alemanha). As análises foram feitas usando o *software imageJ* (NIH, fornecido gratuitamente no sítio <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

5.7 Análises *in-silico*

microRNA-array: 12 amostras de tumores foram selecionadas para a análise (6 SED+CT26 e 6 TR8+CT26), o RNA dessas amostras foram extraídos pelo método citado na seção 3, e, logo após, as amostras de RNA foram purificadas usando o kit mirVana™ (*Thermo Fisher Scientific*, #AM1556), as amostras foram acondicionadas em -80°C. Após padronizar a concentração em 400ng de RNA por amostra, essas foram tratadas com o kit *FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling* (*Affymetrix, USA*), foram seguidas instruções do fabricante. Os componentes deste *Kit* possibilitam a extensão de cauda poli-A no RNA, seguido da marcação com biotina, após essa marcação as amostras foram inseridas em *Chips* com *probes* de microRNAs conhecidos para hibridização, utilizou-se *GeneChip™ miRNA Arrays* versão 4.0 (*Affymetrix, USA*), foi utilizado um *Chip* por amostra. A leitura dos *chips* possibilitou a determinação de um perfil de expressão dos microRNAs nos tumores dos camundongos.

Predição bioinformática: O programa *Transcriptome Analysis Console* (TAC, *Affymetrix, USA*) foi utilizado para o processamento dos dados obtidos da leitura dos *chips*, com esse programa foi possível obter a lista com a expressão microRNAs de acordo com os grupos e produzir o *heatmap*. Foram utilizadas quatro plataformas de bioinformática para predição dos alvos dos miRNAs, miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), mirnet (<https://www.mirnet.ca/>), mirbase (<https://www.mirbase.org/>) e Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>). A seleção dos genes foi descrita na seção de resultados.

5.8 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 ou dois caminhos. No caso de interação significativa na ANOVA, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey. Para as análises de correlação foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância adotado nesse estudo foi de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Desenho experimental;

Camundongos Balb/c inoculados com células de câncer de cólon CT26 foram divididos em grupos da seguinte forma: câncer sedentário (SED+CT26), câncer treinado (TR+CT26), câncer treinado quatro semanas antes do inóculo das células tumorais (TR4+CT26), câncer treinado oito semanas antes do inóculo das células tumorais (TR8+CT26), além de um grupo controle saudável sedentário (WT).

O protocolo de treinamento iniciou na 8ª semana de vida dos animais para o grupo TR8+CT26 e na 12ª semana de vida para o grupo TR4+CT26. Na 16ª semana de vida dos animais foram inoculadas as células tumorais em todos os grupos com câncer. Após o inóculo das células tumorais esperamos aproximadamente cinco dias para retomar o protocolo do TFA para os grupos TR4+CT26 e TR8+CT26. Este prazo foi dado para garantir que os tumores estivessem palpáveis e a iniciação tumoral não fosse influenciada por lesão mecânica nas células tumorais, que eventualmente o TFA pudesse promover. Ao retomar o protocolo de TFA os TR4+CT26 e TR8+CT26 treinaram por mais 11 dias, neste momento o grupo TR+CT26 iniciou o protocolo de treinamento e treinou pelo mesmo período de tempo (desenho experimental esquematizado na Figura 6).

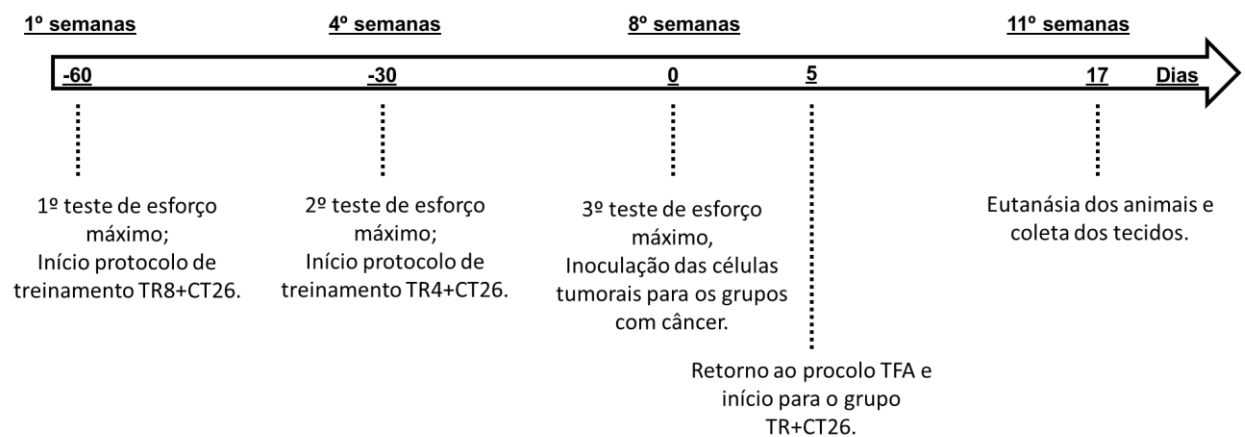


Figura 6: Figura esquemática do desenho experimental do estudo mostrando o transcorrer das intervenções ao longo do tempo. TFA= treinamento físico aeróbico; Sed+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado (não previamente a inoculação); TR4+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 4 semanas; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

6.2 Marcadores de treinamento e caracterização dos grupos;

A eficiência dos protocolos de treinamento foi avaliada pelo teste de esforço máximo. O teste foi realizado em dois momentos; o primeiro antes do início dos protocolos de treino (identificado como Pré), nesse momento não houve diferença entre nenhum dos grupos mostrando que todos os animais apresentavam a mesma capacidade física. O primeiro teste máximo também foi utilizado como parâmetro para determinar a carga do protocolo de treinamento, onde utilizamos 60% da capacidade máxima de cada animal para os grupos treinados. O segundo momento foi após o término dos protocolos de treinamento, e apenas o protocolo de 8 semanas de treinamento prévio foi eficiente em aumentar a capacidade de resistir ao esforço máximo (Figura 7A). Cabe salientar que o grupo TR8+CT26 realizou na quarta semana de treino um outro teste de esforço máximo para ajuste de carga de treinamento. Todos os testes foram realizados antes dos animais serem inoculados com células tumorais.

O volume do tumor foi acompanhado diariamente desde o momento que se tornou paupável. Os resultados mostram que todos os grupos que realizaram protocolos de treinamento físico, TR+CT26, TR4+CT26 e TR8+CT26, apresentaram menor volume tumoral comparado com o grupo SED+CT26, a partir do 13º dia com o tumor. Ainda cabe ressaltar que não houve diferença do volume tumoral entre os grupos que realizaram TFA (Figura 7B)

Há uma correlação entre o desempenho no teste de esforço máximo e o volume tumoral. Quanto maior a capacidade de resistir ao esforço menor é o volume tumoral (Figura 7C).

A massa corporal dos animais foi acompanhada periodicamente após realizarmos o inóculo das células tumorais. Os resultados mostram que não há diferença na massa corporal de todos os grupos até o 14º dia com tumor, a partir desse momento observamos que a massa corporal dos animais do grupo TR8+CT26 foi significativamente menor comparada com a massa corporal do grupo SED+CT26. Cabe dizer que houve diferença no volume tumoral entre esses dois grupos e esse fator interfere na massa corporal dos animais (Figura 7D).

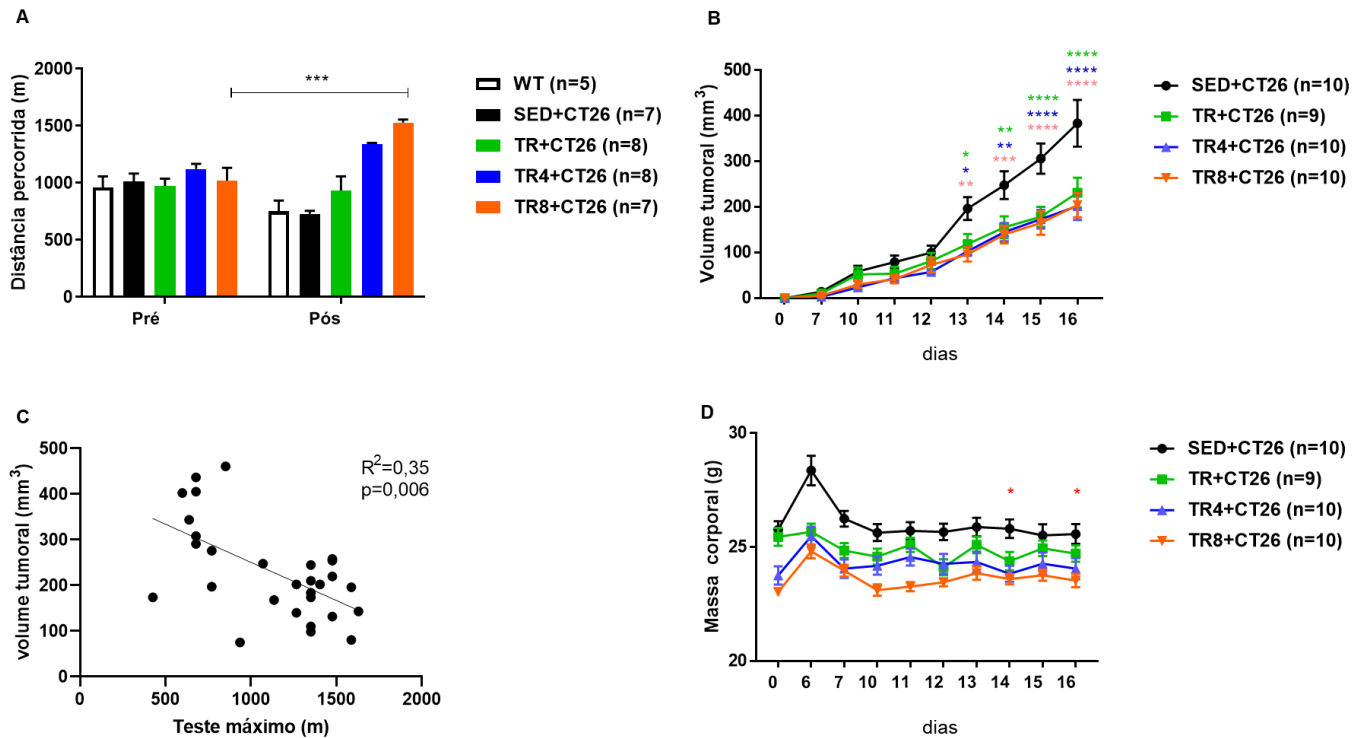


Figura 7: (A) Distância percorrida no teste máximo até exaustão; (B) Volume tumoral (mm³) (C) correlação entre volume tumoral e distância percorrida até exaustão (D) Massa corporal (g). WT = grupo saudável sedentário; SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado (não previamente a inoculação); TR4+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 4 semanas; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas. * $p<0,05$ vs. SED+CT26, ** $p<0,01$ vs. SED+CT26, *** $p<0,001$ vs. SED+CT26, **** $p<0,001$ vs. SED+CT26.

O grupo TR8+CT26 apresentou menor crescimento tumoral comparado com o grupo sedentário e foi o único que apresentou melhora no teste de esforço máximo, mostrando melhora na capacidade aeróbica. Baseado nesse resultado nós decidimos prosseguir analisando apenas esse grupo como grupo treinado, dessa forma apresentaremos os futuros resultados reportando apenas grupo saudável sedentário (WT), câncer sedentário (SED+CT26) e câncer treinado (TR8+CT26).

Avaliou-se o papel do TFA na sobrevida dos animais com câncer. Para manter uma conduta ética no tratamento com os animais foram estabelecidos alguns critérios para encerrar o experimento,: 1) os animais foram eutanasiados quando o volume tumoral atingiu 1 cm³; esse volume foi estabelecido por ser um critério vastamente utilizado pela comunidade científica como um ponto máximo para manter camundongos de modelos ortotópicos vivos sem sofrimento excessivo (101); 2) os animais que estavam agonizantes e com morte iminente foram sacrificados. Os animais eram imediatamente eutanasiados ao alcançar um desses critérios.

A diferença do crescimento tumoral foi mantida entre animais sedentários e treinados, mesmo por um período de tempo maior com o tumor (Figura 8A). Isso se relaciona com o aumento da sobrevida dos animais do grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 8B).

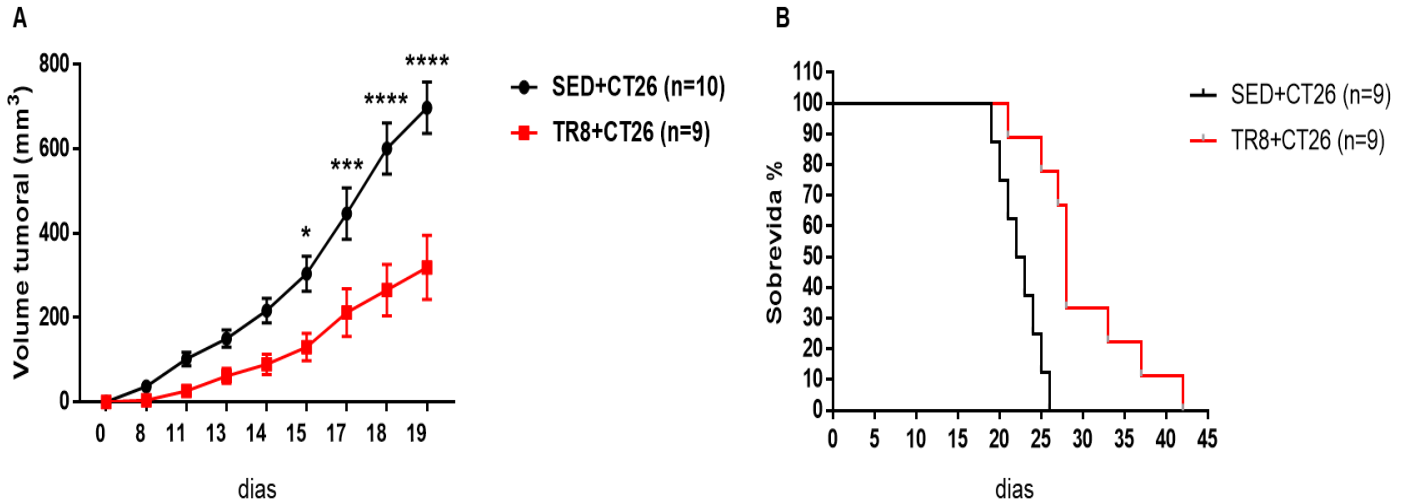


Figura 8: (A) Volume tumoral (mm³); (B) Porcentagem de sobrevida em dias com tumor. SED+CT26 grupos câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

6.3 Massa dos tecidos e consumo de água e ração;

Uma vez que a massa muscular está diretamente relacionada com alterações metabólicas, os músculos foram pesados, entretanto não foram observadas diferenças significativas no tecido muscular esquelético entre os grupos treinados e sedentários com câncer (Tabela 2).

Os animais com câncer apresentaram perda do conteúdo de gordura perigonadal, quando comparados com o grupo WT. O TFA foi capaz de prevenir parcialmente essa perda (Tabela 2). Esses dados estão intimamente associados com o desenvolvimento da caquexia que está relacionada, também, com a perda de massa gorda do tecido adiposo branco. Ainda, avaliamos a massa do tecido adiposo marrom, que foi retirado do dorso dos animais. Não foi observada diferença na massa desse tecido entre os grupos (Tabela 2).

A massa do fígado aumentou nos animais com câncer sedentários e treinados quando comparados com os animais controle saudáveis sedentários. Entretanto o aumento da massa do fígado foi mais acentuado no grupo SED+CT26 (Tabela 2). O conjunto desses dados mostram que a massa dos tecidos que influenciam diretamente no consumo energético está alterada nos grupos com câncer.

Ainda, outros tecidos foram pesados, sendo eles: baço, coração e pulmão. Os resultados mostram que os animais com câncer apresentam acentuada esplenomegalia, observada pelo aumento no peso do baço do grupo SED+CT26 comparado com o grupo WT. O TFA preveniu parcialmente esse aumento comparando com o grupo SED+CT26 (Tabela 2).

A massa do coração e do pulmão aumentou nos grupos com câncer, porém não foram observados efeitos do TFA (Tabela 2).

Tabela 2: Massa dos tecidos corrigido pelo comprimento da tíbia (g/mm); (SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas; WT = grupo saudável sedentário. *p<0,05 vs. WT; **p<0,01 vs. WT; ***p<0,001, #p<0,05 vs. SED+CT26).

MASSA DOS TECIDOS (G/MM)

	WT	SED+CT26	TR8+CT26
GASTROCNÊMIO	6,8 ± 0,6	6,6 ± 0,6	6,4 ± 0,8
TIBIAL ANTERIOR	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,4
SÓLEO	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0
TECIDO ADIPOSEO MARROM	6,2 ± 1,7	4,9 ± 0,8	5,1 ± 2,1
GORDURA PERIGONADAL	7,4 ± 0,8	0,8 ± 1,4 **	3,0 ± 2,1 *#
FÍGADO	62,0 ± 7,9	91,7 ± 11,9 **	81,5 ± 11,4 *
BAÇO	7,1 ± 1,0	32,8 ± 7,4 ***	20,7 ± 5,7 ***#
CORAÇÃO	6,4 ± 0,4	8,3 ± 0,9 **	8,4 ± 1,3 **
PULMÃO	7,1 ± 0,2	9,2 ± 1,8 *	9,5 ± 0,8 *

Para avaliar se o resultado de perda de massa de alguns tecidos estava relacionado com a diminuição da ingestão de nutrientes, os animais foram submetidos ao teste de consumo de nutrientes e produção de excrementos, gaiola metabólica. Uma vez por semana, após a inoculação das células tumorais, os animais foram submetidos a gaiola metabólica e avaliou-se em todos os grupos experimentais o consumo de ração, consumo de água, perda de massa corporal e excreção de fezes para avaliar se houve diferença no metabolismo energético dos animais em decorrência do consumo de alimento. O teste foi realizado em três momentos: o primeiro após a inoculação das células tumorais (0 dias com tumor), o segundo após 7 dias com o tumor e o terceiro, após 14 dias com o tumor.

Os animais foram submetidos a adaptação ao teste da gaiola metabólica antes que os resultados fossem computados. Entretanto, percebe-se que mesmo após a adaptação, os resultados da primeira medição apresentaram uma grande variação devido à falta de familiaridade dos animais com o teste.

A massa corporal foi avaliada antes dos animais serem colocados na gaiola e após os animais serem retirados depois de 24 horas. Para o cálculo da massa corporal, o valor da massa corporal antes do teste foi subtraído pelo valor após o teste, resultando um delta da massa corporal, sendo assim, maiores valores do delta mostram maiores perdas de massa corporal. Com 0 e 7 dias com o tumor os animais não apresentaram diferença no delta da massa corporal, entretanto com 14 dias com o tumor os animais do grupo SED+CT26 apresentaram maior perda da massa corporal em 24 horas comparado com os animais WT e TR8+CT26 (Figura 9A).

O consumo de ração e água não foi diferente entre os grupos, em nenhum dos momentos em que os animais foram colocados na gaiola metabólica (Figura 9B e 9C). Entretanto a excreção de fezes foi menor nos animais com câncer com 14 dias com tumor comparado com os animais do grupo WT.

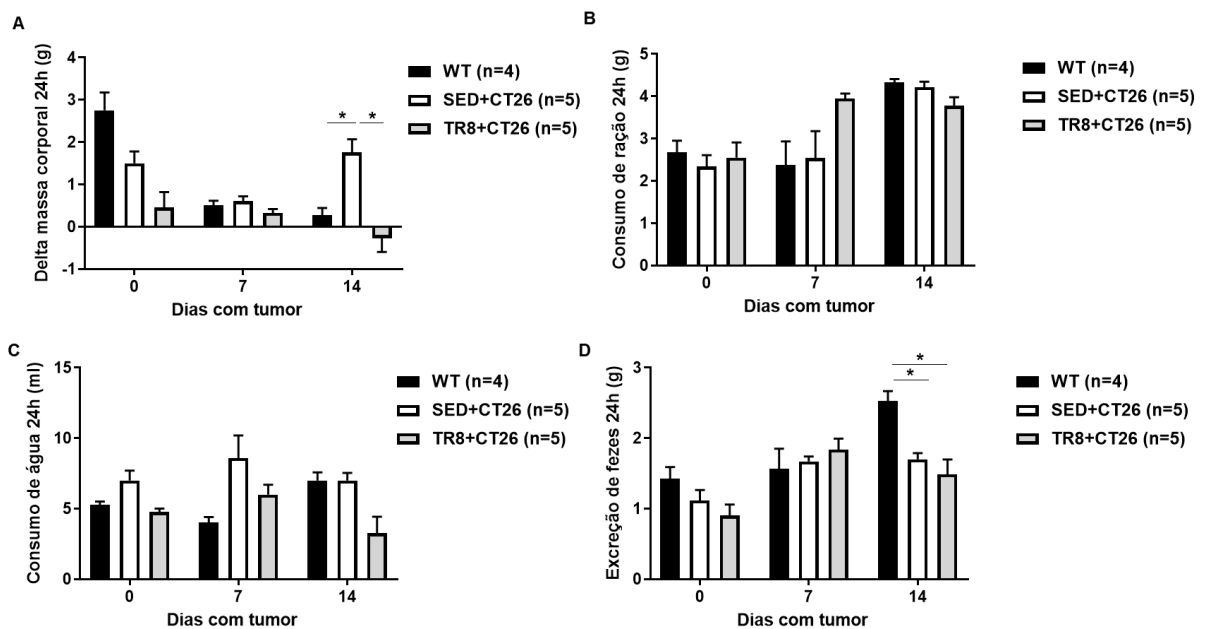


Figura 9: (A) Delta da massa corporal em 24 horas (g); (B) Consumo de ração em 24 horas (g); (C) consumo de água em 24 horas (ml); (D) Excreção de fezes em 24 horas (g). SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas; WT = grupo saudável sedentário. * $p < 0,05$.

6.4 Genes avaliados no tumor;

Avaliamos a expressão de genes relacionados com vias metabólicas glicolítica. Os primeiros genes avaliados foram as Sirtuínas 1, 3 e 6, não encontramos diferença na expressão desses mRNAs comparando grupo SED-CT26 e TR8-CT26 (Figura 10A, 10B e 10C). A presente

tese foi baseada em resultados preliminares que demonstraram que o TFA aumenta a expressão da SIRT6 em tumores CT26. Entretanto, os presentes resultados são conflitantes com os dados preliminares (Figura 11B). Discutiremos mais adiante a falta de reprodutibilidade dos dados, muito embora cabe dizer no presente momento que as condições que os dois dados foram obtidos foram diferentes.

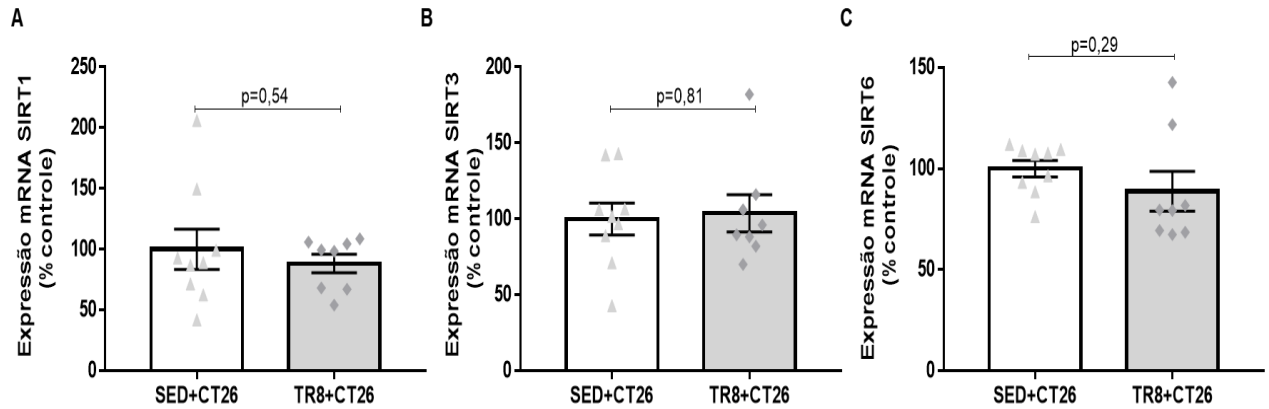


Figura 10: (A) Expressão de SIRT1 (%); (B) Expressão de SIRT3 (%); (C) Expressão de SIRT6 (%). SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

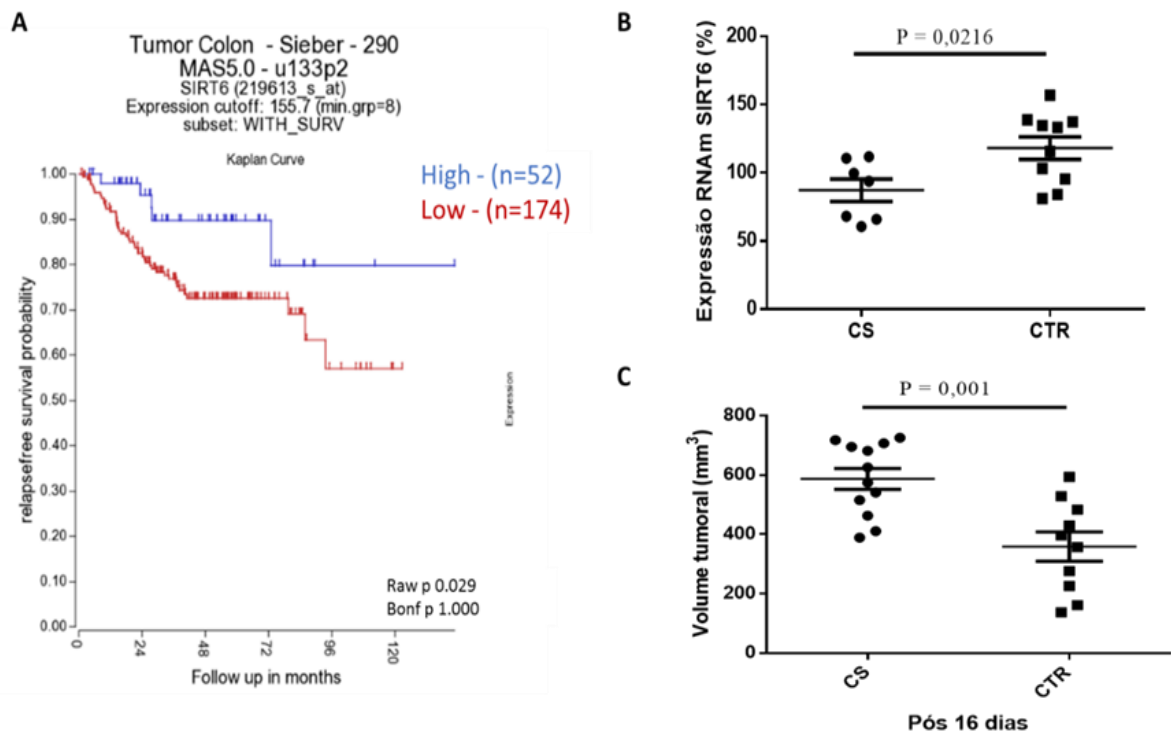


Figura 11: Dados preliminares apresentados na proposta de projeto apresentado em 2017. A) curva de sobrevivida de pacientes com câncer de cólon. B) Expressão gênica da SIRT6 no tumor (células CT26). C) Volume tumoral após 16 dias com células CT26. CS = animais com câncer sedentários (células CT26) e CTR = animais com câncer treinados (células CT26).

Mesmo não encontrado diferença na expressão gênica investigou-se a expressão de microRNAs que alvejam SIRT6. A hipótese inicial desse trabalho era que haveria diminuição da expressão do microRNA-33a-3p no grupo treinado, entretanto não se observou diferença entre os grupos (Figura 12A). Passou-se a investigar a expressão de outros dois microRNAs que também alvejam SIRT6, microRNA-23a-3p e microRNA-24-3p, não houve diferença na expressão desses microRNAs entre os grupos (Figura 12 B e C).

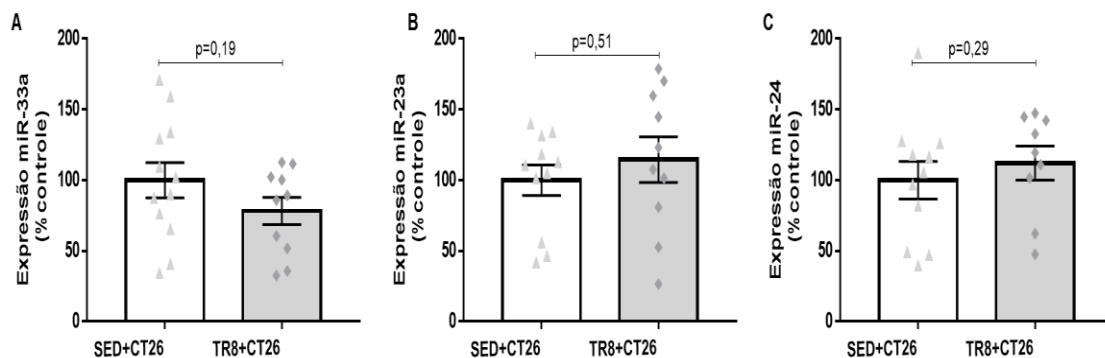


Figura 12: (A) Expressão do miRNA-33a (%); (B) Expressão do miRNA-23a (%); (C) Expressão do miRNA-24. SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas. * $p < 0,05$.

Avaliou-se a expressão de outros mRNAs relacionados com o metabolismo glicolítico. A expressão de HIF1 α foi significativamente diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 13A). Não observamos diferença na expressão de c-MYC entre os grupos (Figura 13B).

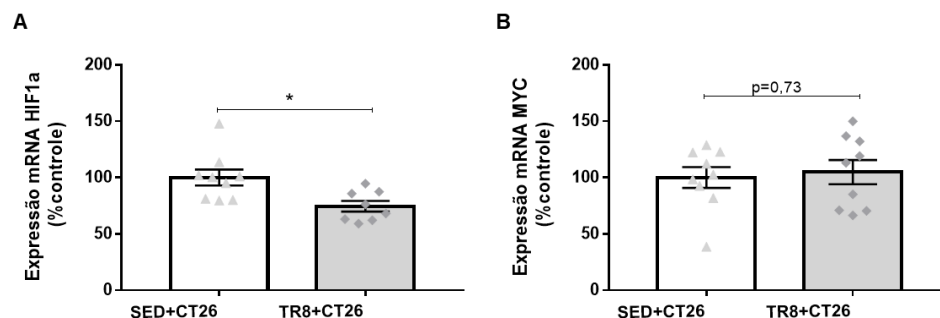


Figura 13: (A) Expressão de HIF1 α (%); (B) Expressão de c-MYC (%). SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas. * $p < 0,05$.

Houve uma tendência de diminuição da expressão de GLUT1 no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 14A), no entanto não houve diferença na expressão

de HK1, PFK1, PKM1, PKM2 e PDHa entre os grupos (Figura 14B-14F). A expressão de PDK1 ($p=0,052$) e LDHa estava diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 14G e 14H).

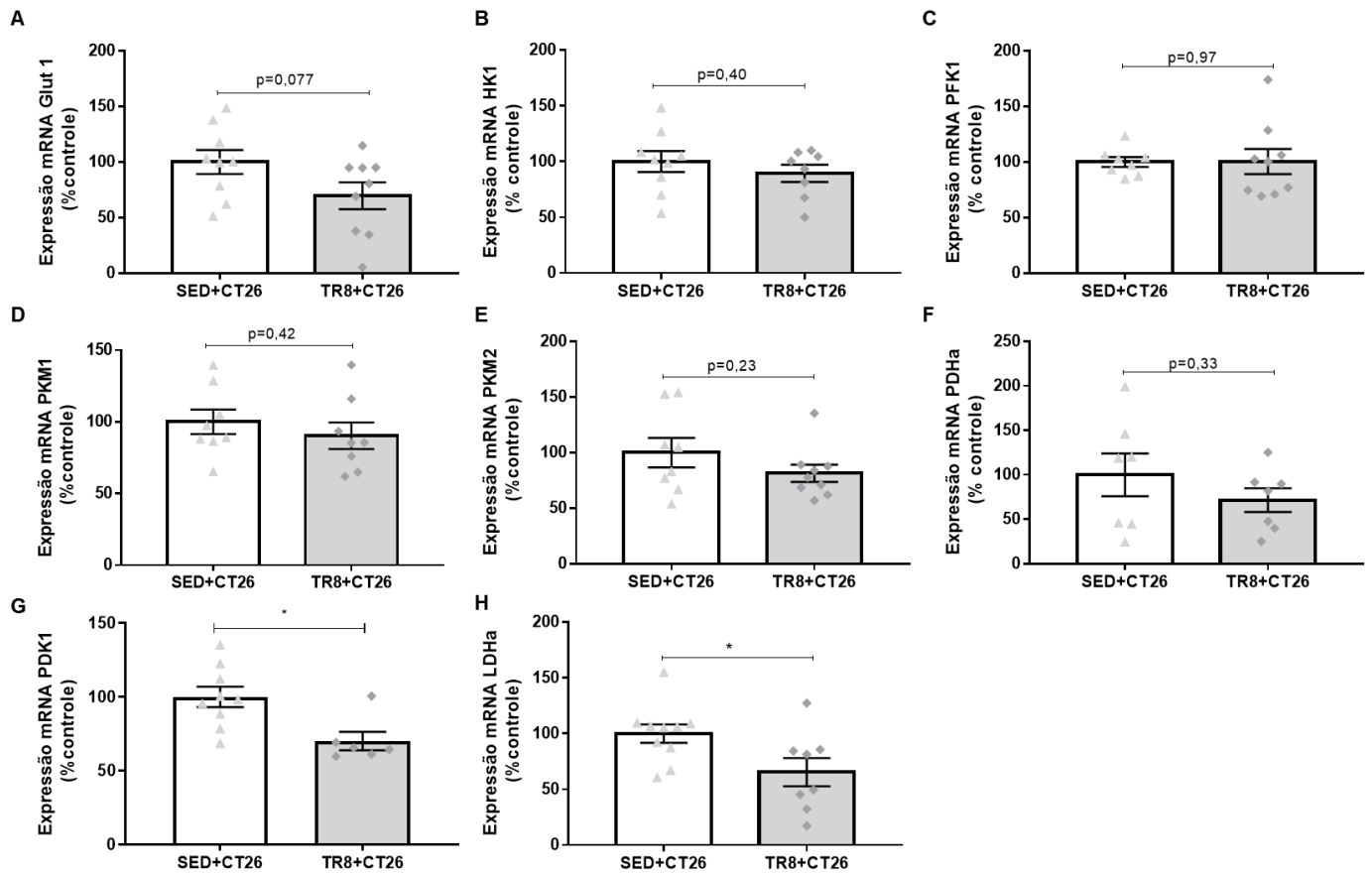


Figura 14: (A) Expressão de Glut1; (B) Expressão de HK; (C) Expressão de PFK1; (D) Expressão de PKM1; (E) Expressão de PKM2; (F) Expressão de PDHa; (G) Expressão PDK; (H) Expressão de LDHa. SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas. * $p<0,05$. Todos os resultados estão expressos em percentual do grupo SED+CT26 (%).

Tendo em vista que os resultados da expressão gênica de HIF1 α , LDHa GLUT1 e PDK1 apresentaram tendência ou diminuição de expressão em decorrência do TFA, realizou-se uma avaliação de correlação da expressão desses genes com o volume tumoral dos animais. Não se observou nenhuma correlação entre a expressão dos genes e o tamanho do tumor (figura 15A, 15B, 15C e 15D).

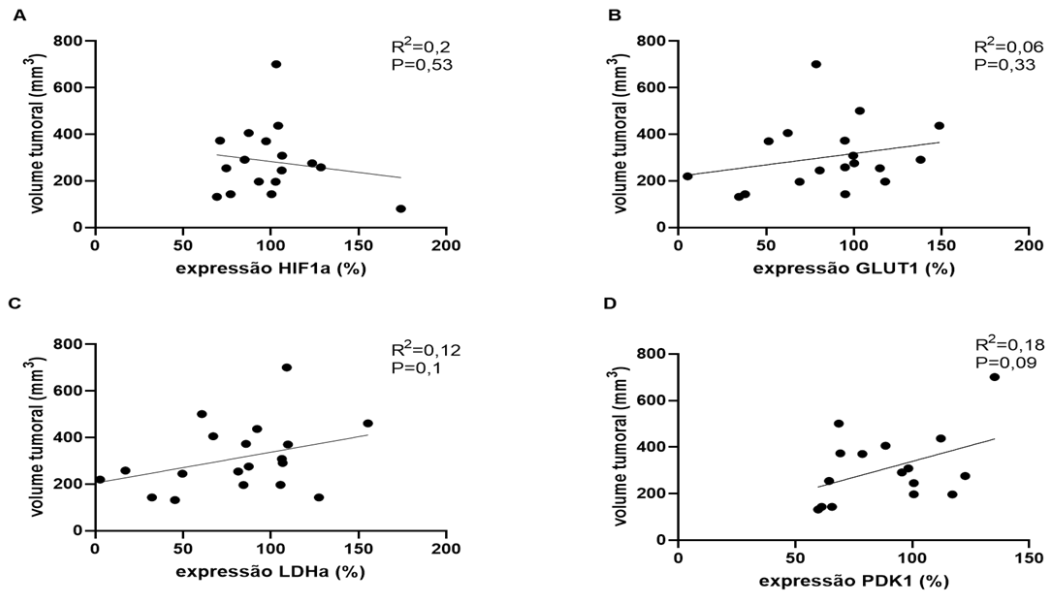


Figura 15: Teste de correlação entre volume tumoral e A) expressão de mRNA HIF1 α ; B) expressão de mRNA GLUT1; C) expressão de mRNA LDHa e expressão de mRNA PDK1. Para o teste utilizou-se valores de animais dos grupos SED+CT26 e TR8+CT26. Considerado significativo quando $P<0,05$ e $R^2>0,3$.

Testes de correlação também foram realizados para avaliar se diminuição da expressão em decorrência do TFA de HIF1 α , LDHa GLUT1 e PDK1 estavam relacionadas com a capacidade aeróbica máxima dos animais. Observou-se que há uma correlação negativa significativa entre a capacidade máxima aeróbica e a expressão de GLUT1 (Figura 16B) e de LDHa (Figura 16C) no tumor. Não há correlação entre a expressão de HIF1 α (Figura 16A) e PDK1 (Figura 16D) e a capacidade de aeróbica máxima.

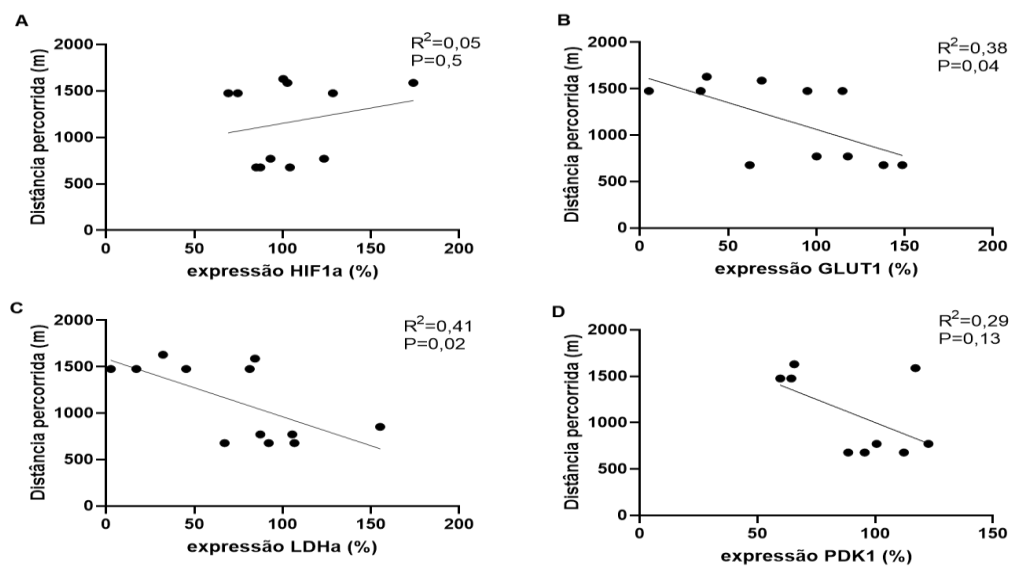


Figura 16: Correlação entre a distância máxima percorrida no teste de esforço máximo e A) expressão de mRNA HIF1 α ; B) expressão de mRNA GLUT1; C) expressão de mRNA LDHa e D) expressão de mRNA PDK1. Para o teste utilizou-se valores de animais dos grupos SED+CT26 e TR8+CT26. Considerado significativo quando $P < 0,05$ e $R^2 > 0,3$.

Foram analisados genes que codificam enzimas do ciclo do ácido cítrico. Essa escolha foi motivada pela alteração na expressão gênica de HIF1 α , LDHa e PDK1. Observou-se que o gene da isocitrato desidrogenase 2 (IDH2) apresentou diminuição da expressão no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 17D). A expressão gênica de succinato desidrogenase subunidade A (SDHa) apresentou diminuição no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (figura 17G). Esses genes alterados codificam enzimas responsáveis pelas reações 4 (reação de descarboxilação) e 6 (reação de fosforilação e formação de GTP) do ciclo, respectivamente. Os demais genes do ciclo, tais como, citrato sintase (CS), aconitase 1 (ACO1), isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), alfa-cetoglutarato desidrogenase 1 (KGDH1), succinil- CoA ligase (SUCLA), fumarato hidratase 1 (FH1), e malato desidrogenase 1 e 2 (MDH1 e 2) não apresentaram diferença (figura 17).

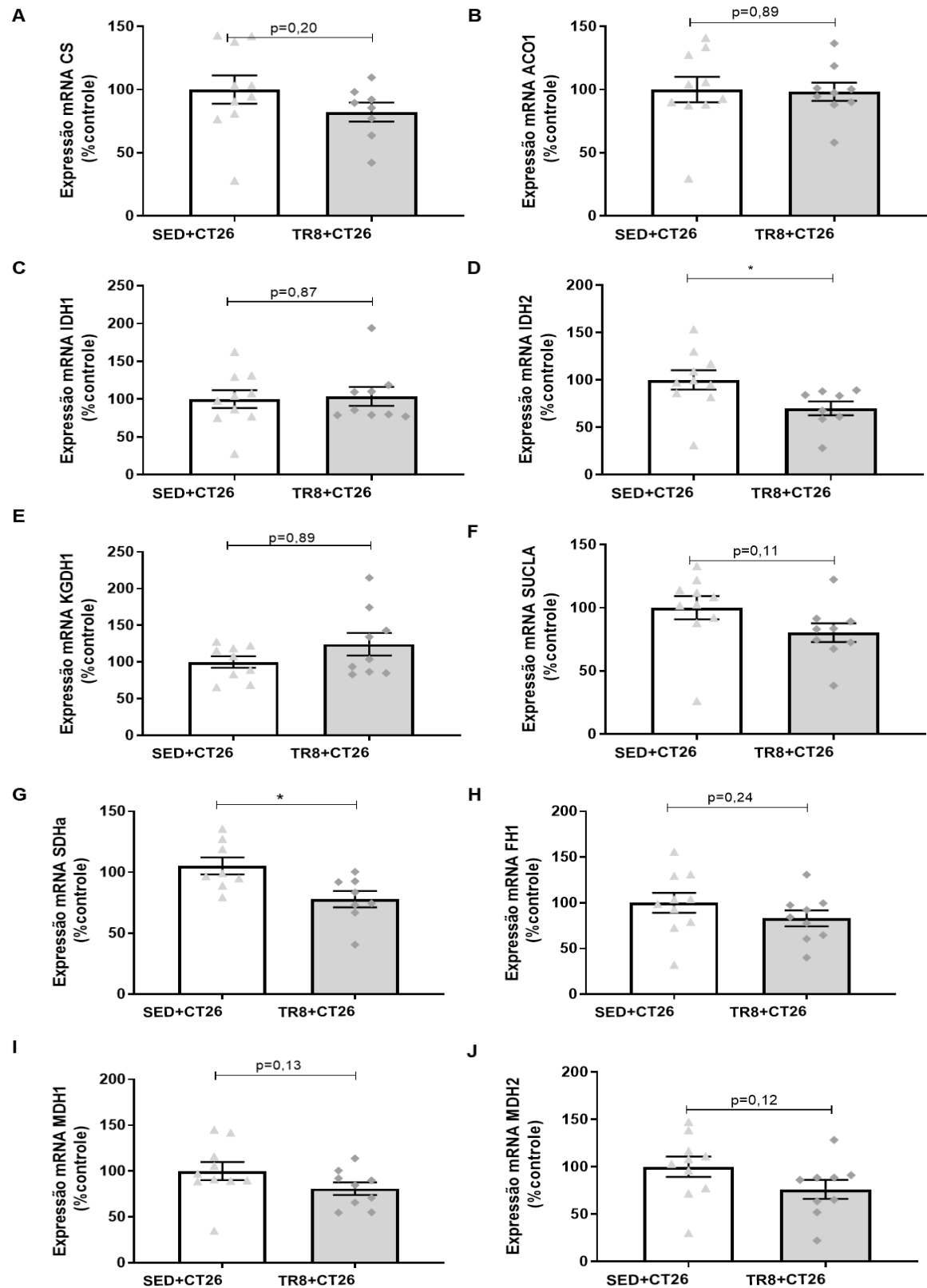


Figura 17: (A) Expressão de CS; (B) Expressão de ACO1 (%); (C) Expressão de IDH1 (%); (D) Expressão de IDH2 (%); (E) Expressão de KGDH1 (%); (F) Expressão de SUCLA (%); (G) Expressão SDHa (%); (H) Expressão de FH1 (%); (I) Expressão de MDH1 (%); (J) Expressão de MDH2 (%). Sed+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas. * $p < 0,05$. Todos os resultados estão expressos em percentual do grupo SED+CT26 (%).

6.5 Cultura celular: *Seahorse* e expressão gênica;

Uma vez que o TFA levou a diminuição da expressão de genes que codificam enzimas da via glicolítica e HIF1 α nos tumores, avaliamos se o metabolismo das células tumorais também apresentava diferença entre sedentários e treinados. Para isso fragmentos dos tumores dos grupos SED+CT26 e TR8+CT26 foram colocados em cultura para obter uma cultura primária desses tumores. Essas células primárias foram então inoculadas em novos animais sedentários e se formaram novos tumores, os animais permaneceram sedentários, o objetivo desse processo foi observar alterações de longa duração do TFA nas células primárias de TR8+CT26. Coletou-se fragmentos dos tumores que novamente foram colocados em cultura. Dessa forma, gerou-se duas linhagens células a primeira 1) C.P.SED+CT26 (Célula primárias originada dos tumores do grupo sedentário CT26) e a segunda 2) C.P.TR8+SED (Célula primárias originada dos tumores do grupo treinado previamente por 8 semanas - CT26).

As células foram submetidas ao teste *mitostress* no equipamento *Seahorse* (*Agilent*). Esse teste permite analisar a capacidade de respiração celular e medir a acidificação do meio celular. A partir desses testes foi possível determinar a respiração mitocondrial, oxidação máxima de substratos e capacidade glicolítica máxima.

Os resultados encontrados mostram que a taxa de consumo de oxigênio (OCR) é menor nas células C.P.TR8+SED comparado com as células C.P.SED+CT26 (figura 18A). A respiração celular mitocondrial também é menor nas células C.P.TR8+SED, a respiração não mitocondrial é baixa em ambas as células e não foi observado diferença entre elas (Figura 18B). A capacidade de oxidar substratos também foi diminuída nas células C.P.TR8+SED, ainda essas células apresentam uma menor capacidade de reserva de oxidação, comparado com as células C.P.SED+CT26 (figura 18C). A capacidade de produzir ATP também foi diminuída nas células C.P.TR8+SED (Figura 18D). A taxa de acidificação extracelular (ECAR) foi menor nas células C.P.TR8+SED comparado com as células C.P.SED+CT26 (Figura 18E), como também é menor a capacidade glicolítica máxima (Figura 18F).

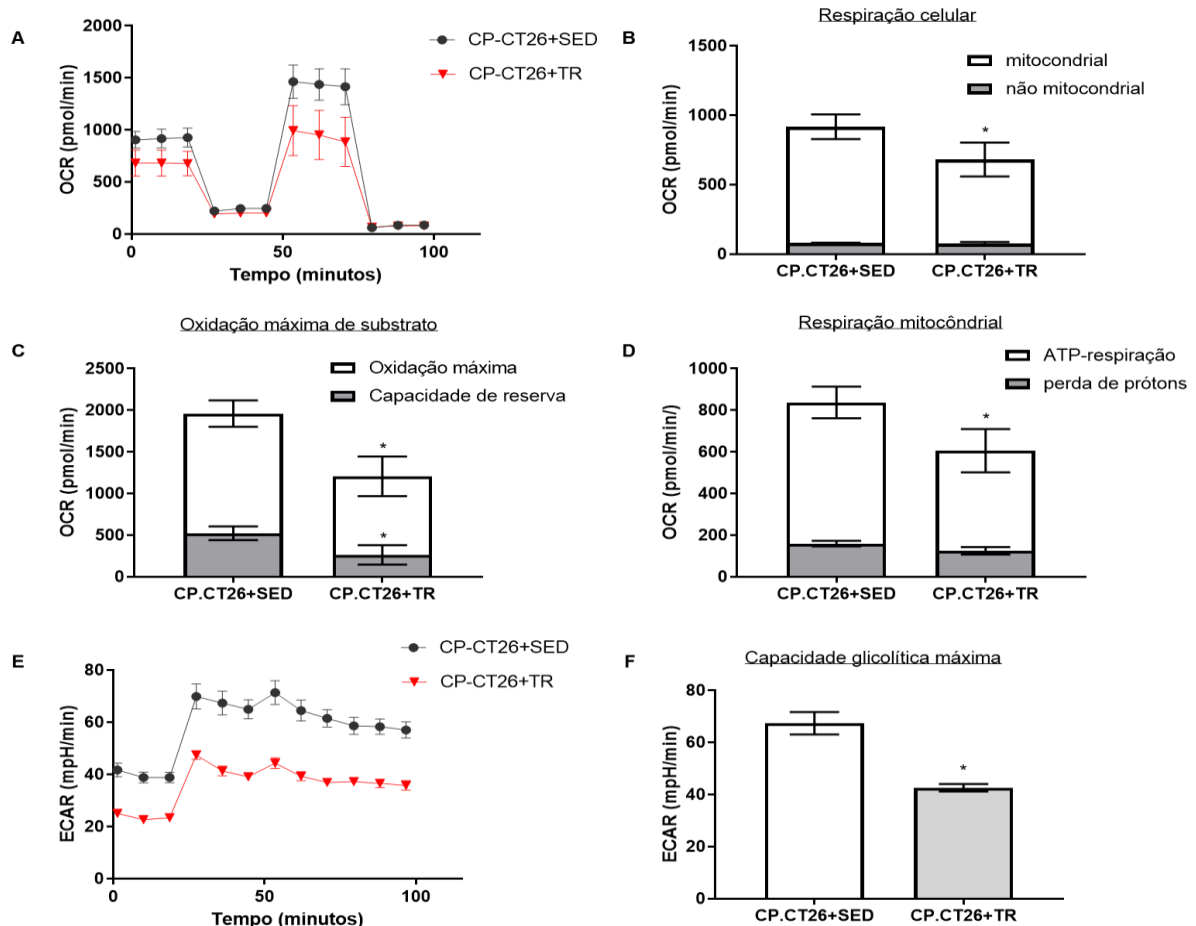


Figura 18: Teste de *mitostress*. A) curva OCR (pmol/min) B) Respiração celular (cálculo realizado a partir da curva OCR [pmol/min]); C) Oxidação máxima de substrato (cálculo realizado a partir da curva OCR [pmol/min]); D) Respiração mitocondrial (cálculo realizado a partir da curva OCR [pmol/min]); E) curva ECAR mpH/min; F) Capacidade glicolítica máxima (cálculo realizado a partir da curva [mpH/min]). C.P.SED+CT26 (Célula primárias originada dos tumores do grupo sedentários CT26) e (Célula primárias originada dos tumores do grupo treinado previamente por 8 semanas - CT26). OCR = taxa de consumo de oxigênio e ECAR = taxa de acidificação extracelular. * $p < 0,05$.

A expressão dos genes SIRT6, SIRT1, SIRT3, PDH1, PDK1, PK1, GLUT1, HK, PKM1, c-MYC e HIF1 α foi avaliada nas células primárias, e somente a expressão de PDH1 foi menor nas células C.P.TR8+SED comparado com as células C.P.SED+CT26 (figura 19).

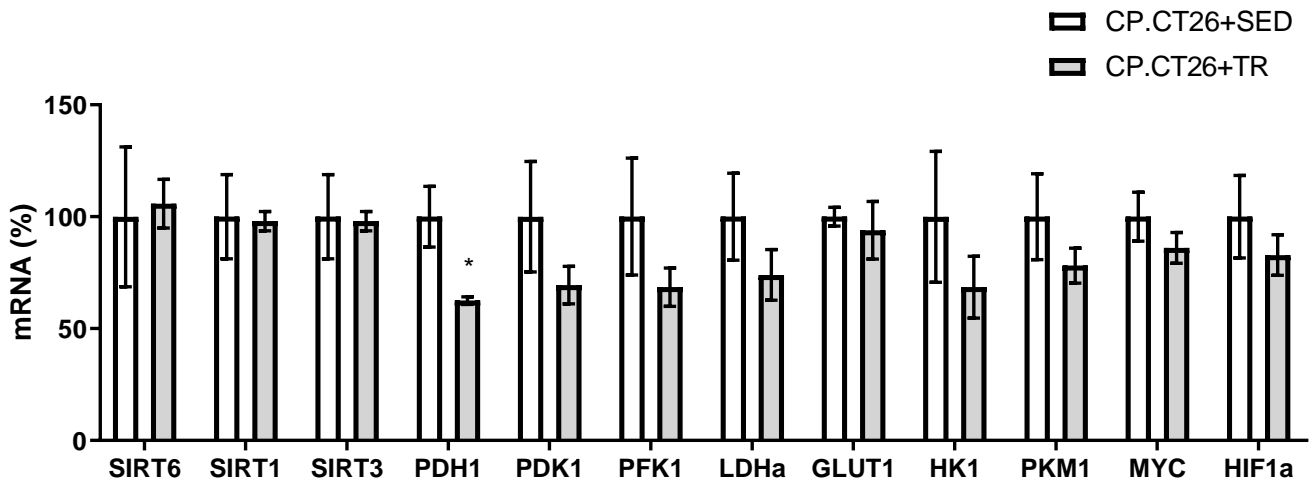


Figura 19: Expressão gênica de SIRT6, SIRT1, SIRT3, PDH1, PDK1, PK1, GLUT1, HK, PKM1, c-MYC e HIF1 α . C.P.SED+CT26 (Célula primárias originada dos tumores do grupo sedentários CT26) e (Célula primárias originada dos tumores do grupo treinado previamente por 8 semanas - CT26). * $p < 0,05$. N=3.

6.6 Cultura celular: respirômetro de alta resolução;

Células primárias foram geradas a partir de tumores de animais sedentários e treinados, a digestão dos tumores foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais. A última sessão de treinamento foi realizada 24 horas antes da eutanásia. Imediatamente após a digestão foi analisada a respiração dessas células por respirômetro de alta resolução. Esse protocolo experimental é diferente das análises por *seahorse* não apenas no aparelho utilizado, mas também porque as análises por *seahorse* foram feitas em células tumorais primárias em cultura e apresentavam passagens de crescimento celular.

Nota-se que não há diferença na respiração celular mitocondrial entre os grupos, também não foi observado diferença na respiração não mitocondrial. Não houve diferença na respiração máxima, na perda de prótons, na capacidade de produção de ATP e na capacidade de reserva entre os grupos (Figura 20).

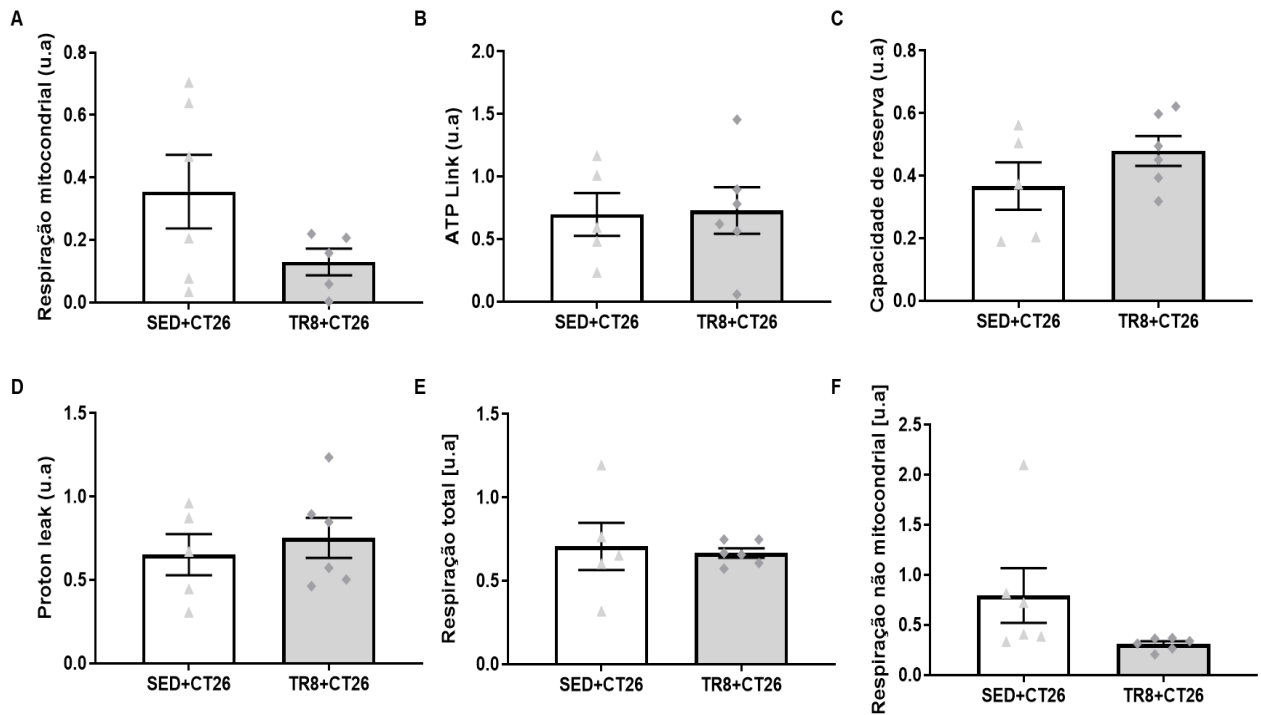


Figura 20: Teste respirômetro de alta resolução. A) Respiração mitocondrial (u.a) B) ATP link – produção de ATP (u.a); C) Capacidade de reserva (u.a); D) Proton leak – perda de prótons (u.a); E) respiração total (u.a); F) respiração não mitocondrial (u.a). u.a = unidade arbitrária. Sed+CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

6.7 Expressão proteica e atividades enzimáticas;

A expressão gênica e proteica de SIRT6 são semelhantes. Não foi observado nenhuma alteração da proteína SIRT6 entre os grupos (Figura 21A). A expressão proteica de HIF1 α acompanha a expressão gênica. Observou-se diminuição da expressão dessa proteína no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 21B). Também foi avaliada a expressão das proteínas MAPK3 e pMAPK3, pois a via de MAPK foi uma das mais alteradas na avaliação *in silico*. Observou-se que a expressão de MAPK3 não apresenta alteração entre os grupos (Figura 21C), entretanto a forma fosforilada, pMAK3, tem expressão diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo sedentário (Figura 21D).

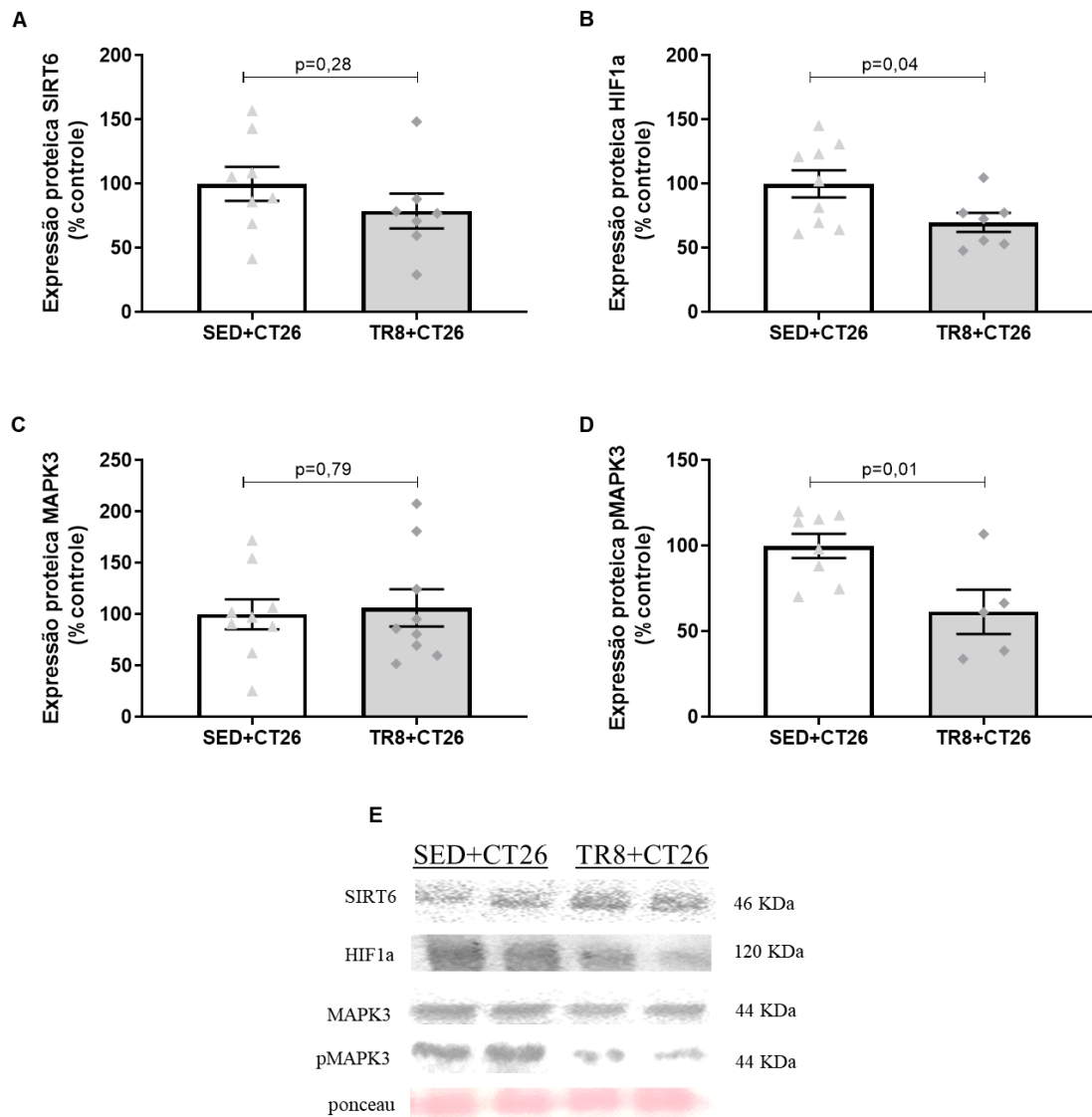


Figura 21: Expressão proteica de (A) SIRT6, (B) HIF1 α (C) MAPK3, (D) pMAPK3 e (E) Blots representativos. SED+CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

Avaliou-se a expressão das proteínas dos cinco complexos mitocondriais, CI-NDUF8, CII-SDHa, CIII-UQCRC2, CIV-MTCO e CV-ATP5A. Observou-se que apenas o complexo II (CII-SDH) apresenta diferença entre os grupos treinado e sedentário, no qual houve diminuição da expressão deste complexo em decorrência do treinamento (figura 22B). O complexo II também participa das reações do ciclo do ácido cítrico; a expressão gênica de SDHa nos tumores apresenta diminuição ($p=0,04$) no grupo TR8-CT26 comparado com o SED+CT26.

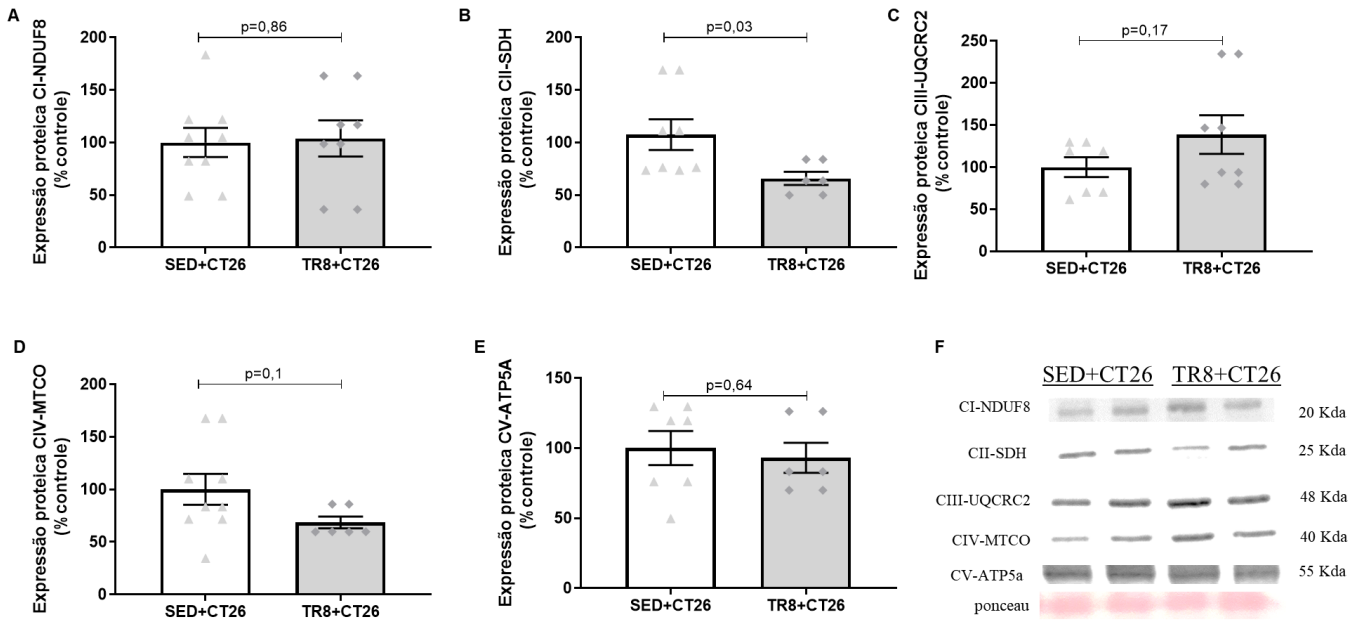


Figura 22: Expressão proteica de A) CI-NDUF8, B) CII-SDHb, C) CIII-UQCRC2, D) CIV-MTCO, E) CV-ATP5A e F) blots representativos. SED +CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

Foi analisado nos tumores a expressão proteica de vias de síntese e apoptose para determinar se essas também estavam relacionadas com a alteração no volume tumoral encontrada no grupo treinado. Não houve alteração na expressão de AKT, PI3K, BAD e MAPCK/P44 (Figura 23 A-D).

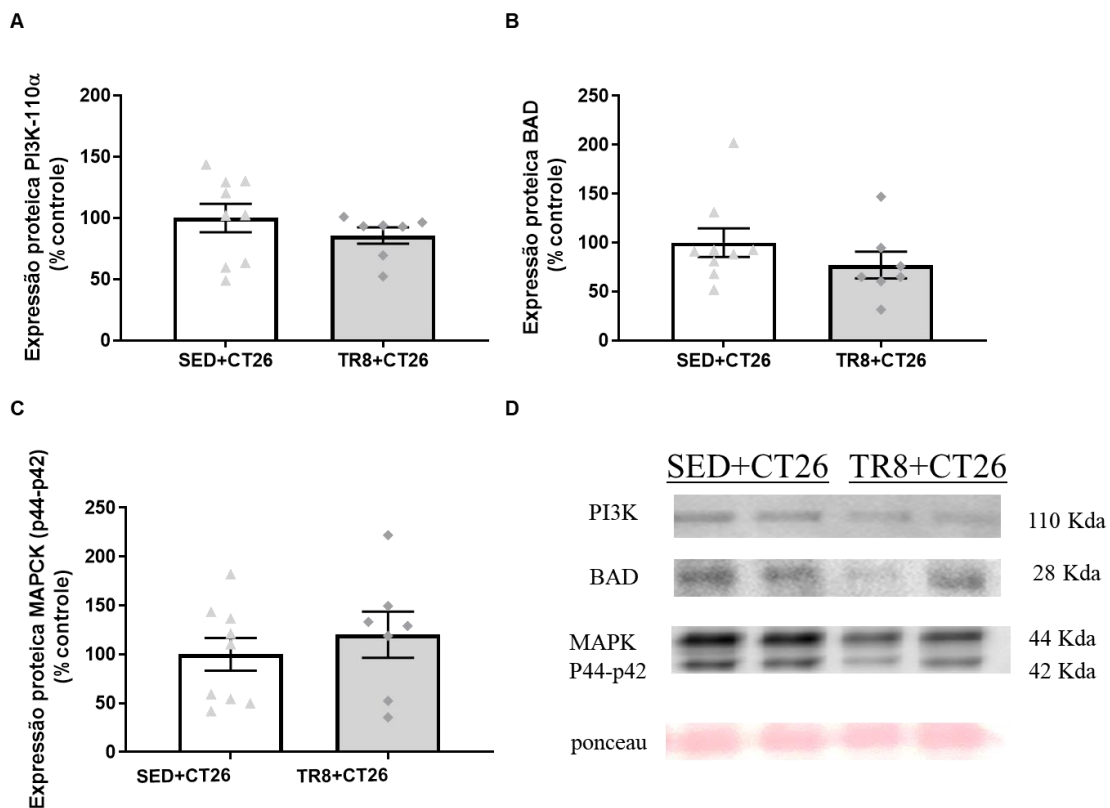


Figura 23: Expressão proteica de (A) PI3K, (B) BAD (C) MAPK-p44-p42, (D) *Blots* representativos. SED+CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

Passamos a analisar a atividade de enzimas ou seus produtos que estivessem relacionados com o metabolismo centrar de carbonos. A atividade da enzima citrato sintase nos tumores não apresentou diferença entre os grupos, acompanhando a expressão gênica dessa enzima que também não foi diferente entre os grupos (Figura 24).

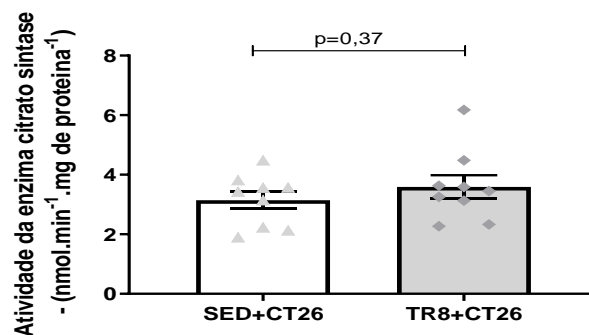


Figura 24: Atividade da enzima citrato sintase (nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹). SED+CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

Analisou-se a produção de glicose-6-fosfato nos tumores e células primárias e não houve alteração entre os grupos (Figura 25A), também não se observou alteração entre os grupos de células primárias (Figura 25B). Não houve alteração na produção de frutose-6-fosfato entre os grupos SED+CT26 e TR8+CT26 (Figura 25C). Não foi possível analisar a atividade da frutose-6-fosfato nas células primárias pela quantidade e concentração de amostras necessárias para utilização do *kit* de reação. Houve diminuição da produção de lactato no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (figura 25D). Esse dado vai ao encontro dos resultados encontrados da expressão gênica de LDHa e HIF1 α , que também apresentam diminuição pelo TFA. Esses genes são intimamente relacionados com a produção de lactato, entretanto não foi possível realizar os testes de lactato nas células primárias.

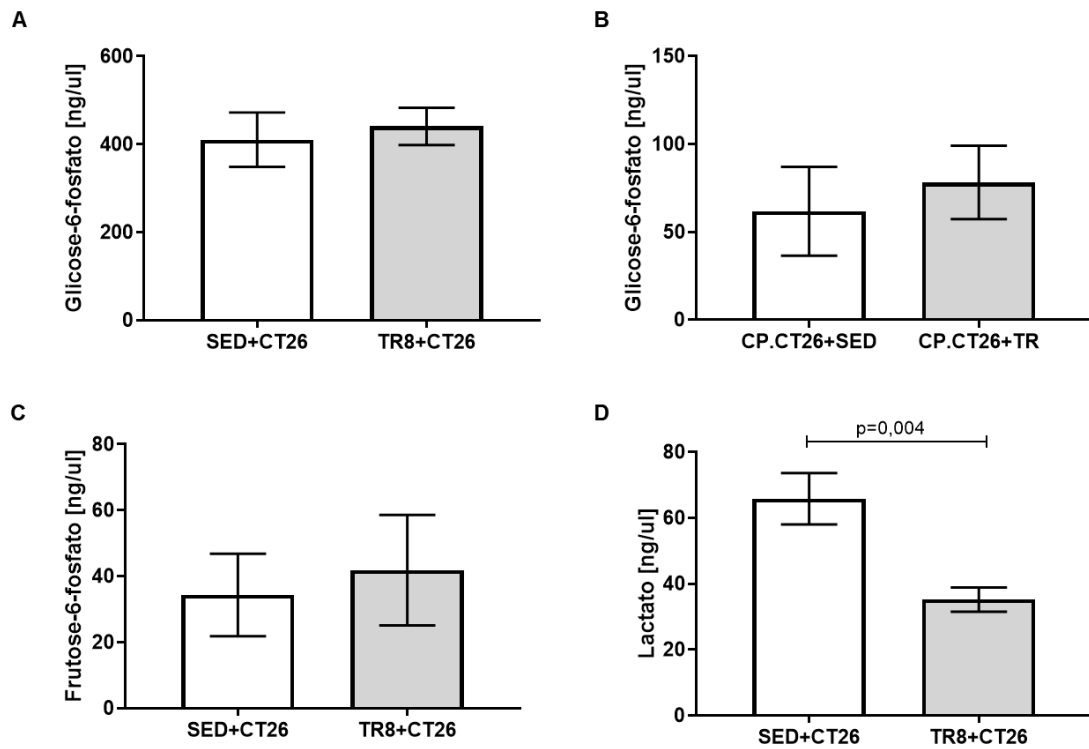


Figura 25: (A) Quantificação do conteúdo de glicose-6-fosfato nos tumores; (B) Quantificação do conteúdo de glicose-6-fosfato em células primárias; (C) Quantificação do conteúdo de frutose-6-fosfato nos tumores. SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário e TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

6.8 Marcadores histológicos

Analisou-se a expressão de HIF1 α por imuno-histoquímica nos tumores, observou-se que a marcação para HIF1 α nas lâminas dos animais treinados era menor comparado com os animais do grupo SED+CT26 (Figura 26B). Esse resultado está de acordo com os dados de expressão gênica e proteica de HIF1 α . Também se analisou a expressão de SIRT6, os dados mostram que o grupo TR8+CT26 apresentava menor marcação comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 26D). A análise por imuno-histoquímica de SIRT6 vai de encontro com as análises de expressão gênica e proteica, onde não se encontrou diferença entre os grupos.

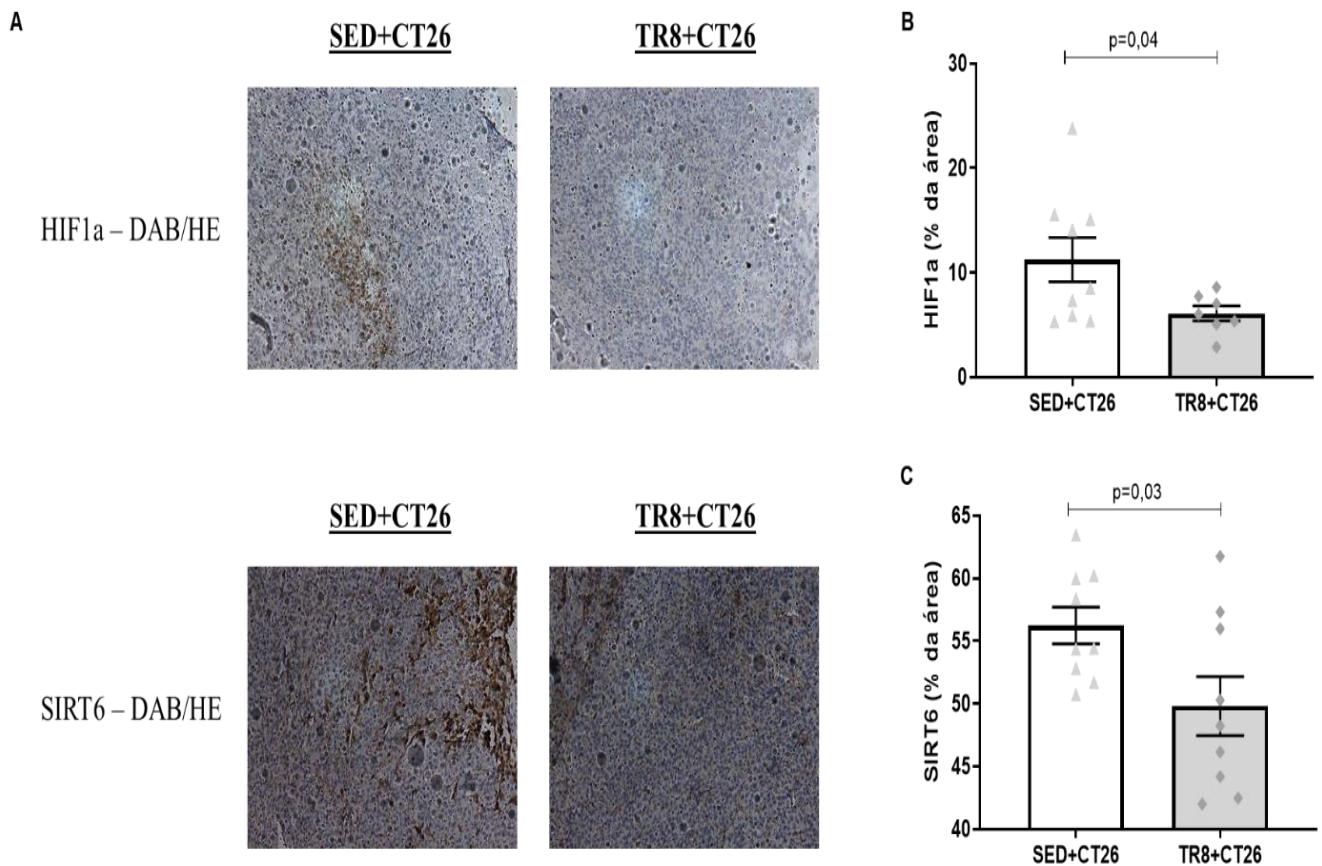


Figura 26: Imuno-histoquímica de HIF1 α e SIRT6. (A) Figura ilustrativa da marcação de HIF1 α ; (B) quantificação da marcação de HIF1 α (% da área); (C) Figura ilustrativa da marcação de SIRT6; (D) quantificação da marcação de SIRT6 (% da área). SED+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário e TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

Outras análises histológicas foram realizadas nos tumores; quantificou-se área de necrose por hematoxilina e eosina, quantidade de lipídios por *oil red* e quantidade de colágeno por *picrossirius red*. Não se encontrou alterações entre os grupos para marcações citadas acima (Figura 27). Pela análise das áreas necrosadas se observou que não houve morte celular excessiva mostrando que os animais foram sacrificados em momento oportuno, e, as amostras de tumores são confiáveis para análises de expressão gênica.

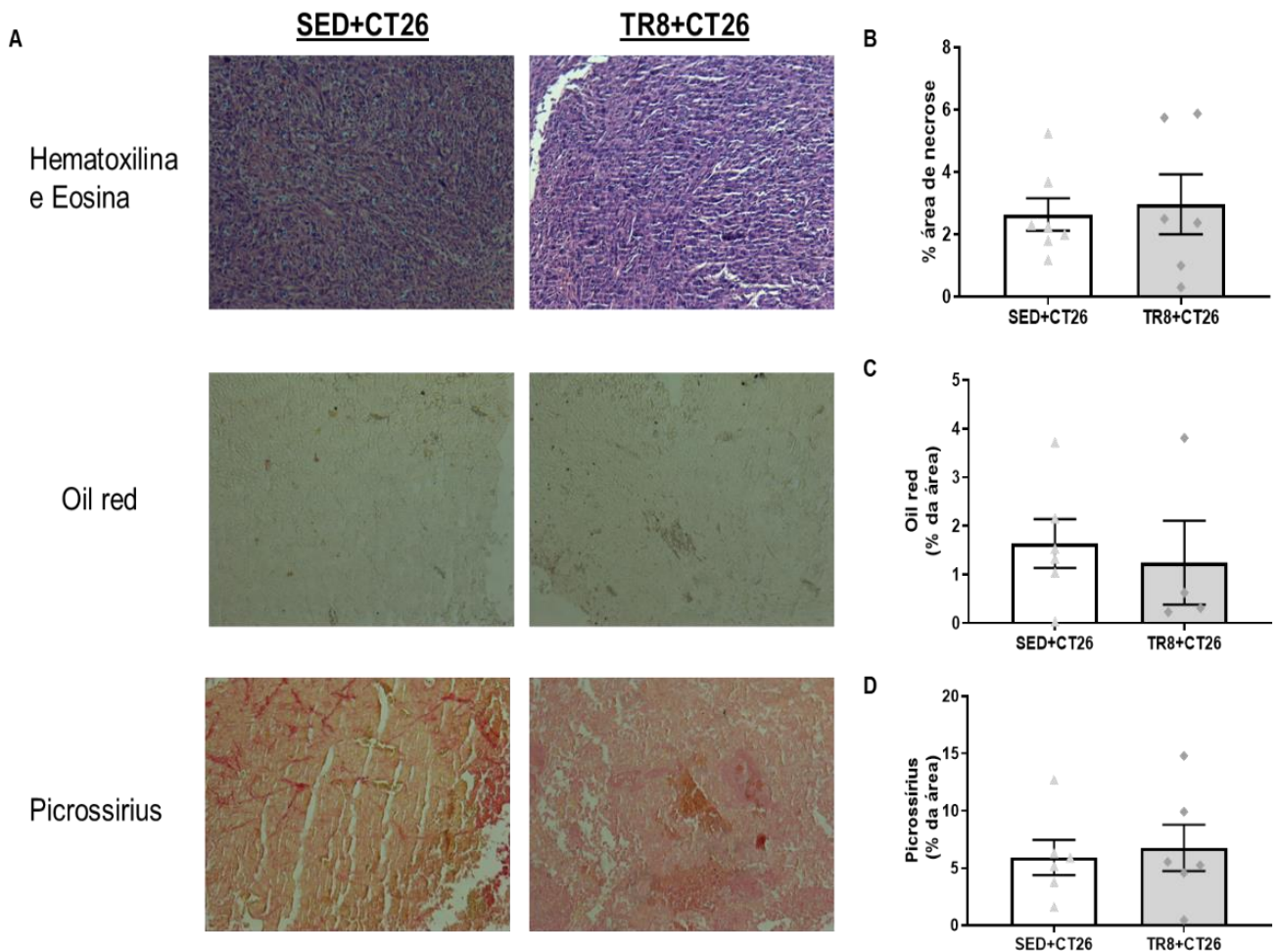


Figura 27: (A) Figura ilustrativa da marcação de Hematoxilina e eosina, *picrosirius* e *Oil red*; (B) quantificação da área de necrose (% da área); (C) quantificação da marcação por *Oil red* (% da área); (D) quantificação da marcação por *picrosirius* (% da área). Sed+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 sedentário e TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

6.9 MicroRNA-Array e análise *in silico* de alvos e sua confirmação

Para verificar o efeito do TFA sobre a expressão global de microRNAs nos tumores foi realizada uma análise de varredura por microRNA *array* com GeneChip™ versão 4.0 (Affymetrix, USA). Para isso foram usadas amostras dos tumores dos grupos SED+CT26 e TR8+CT26. O enfoque dessa análise foi buscar microRNAs que tivessem relação com vias metabólicas e de proliferação celular (promotores de proliferação ou que participassem de vias de evasão do controle de proliferação e crescimento celular).

Para selecionar os microRNAs que estivessem relacionados com tais vias foram utilizados dois mecanismos de análise.

1) Análise de componente principal (*Principal Component Analysis -PCA*):

PCA é um procedimento estatístico utilizado para análise exploratória de um grande conjunto de dados (102). O PCA usa combinações lineares em um grande banco de dados (por

exemplo, os dados brutos obtidos na leitura dos *chips* do microRNA-*array*) para definir um novo conjunto de variáveis não relacionadas (componentes principais) (102). O PCA é utilizado para reduzir as dimensões de um conjunto de dados, permitindo a descrição desses conjuntos e com um número reduzido de variáveis (102).

As análises por PCA que realizamos mostraram que alguns genes expressos em amostras do grupo SED+CT26 se comportam como conjuntos de dados separados de genes do grupo TR8+CT26 (Figura 28). A análise do PCA foi normalizada para deixar os genes em mesma escala de expressão, selecionamos apenas os microRNAs maduros e descritos como opostos entre os grupos. Além disso, as análises geram um valor de porcentagem que reflete a diferença de expressão de um dado gene em relação a todo o conjunto, dessa forma selecionamos apenas microRNAs com valores superiores a 4%. O último passo foi cruzar esse microRNAs selecionados com os dados de *p*-valor gerado pelo TAC, assim selecionamos apenas genes que cumprissem o critério mencionado acima e que também tivessem valor de $P < 0,05$. O resultado final foram 9 microRNAs maduros que apresentavam expressão diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (figura 29).

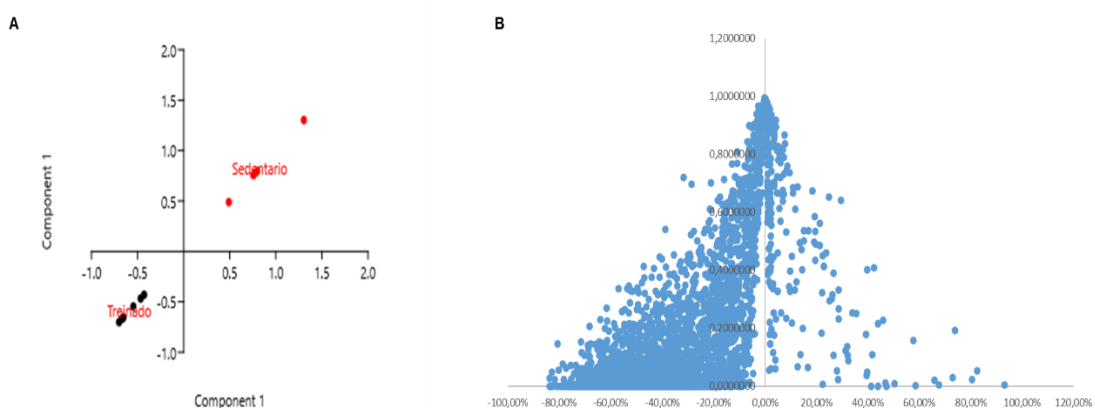


Figura 28: A) Figura ilustrativa demonstrando a separação de genes de acordo com o grupo experimental; B) Separação de componentes/microRNAs de acordo com as análises de PCA.

2) Mecanismos de exclusão por valores de corte a partir de dados estatísticos:

Nessa análise usamos os dados brutos obtidos no programa TCA e colocamos critérios de corte para selecionar genes para futuras análises. O primeiro critério foi aceitar apenas microRNAs maduros, em seguida selecionamos apenas microRNAs que apresentassem diferença no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 com *fold change* 3, que essa diferença também apresentasse valor de $p < 0,05$ e $FDR < 0,01$, além disso o programa deveria reconhecer expressão desse gene como verdadeira nos dois grupos. Dessa forma, dos 3195 microRNAs

encontrados no *Array*, foram selecionados 10 microRNAs maduros após a aplicação dos critérios; todos os 10 microRNAs apresentaram expressão diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (Figura 29). Observou-se que alguns microRNAs selecionados pela análise de PCA também estavam presente nas análises de corte de estatística descritiva (doravante denominada Fold3).

PCA					
#ID transcrito	Fold Change	P-val	FDR P-val	Expressão nos dois grupos	Homologia com humanos
mmu-miR-470-5p	-7,16	1,45E-05	0,0002	Falsa	Não
mmu-miR-299a-3p	-5,17	3,82E-07	1,22E-05	Verdadeira	Não
mmu-miR-7223-5p	-4,33	4,41E-08	2,79E-06	Verdadeira	Não
mmu-miR-6962-5p	-5,01	2,12E-06	3,93E-05	Verdadeira	Não
mmu-miR-135a-2-3p	-3,98	4,13E-08	2,75E-06	Verdadeira	Sim
mmu-miR-6939-5p	-3,44	5,09E-07	1,42E-05	Verdadeira	Não
mmu-miR-410-5p	-3,83	5,16E-08	2,94E-06	Falsa	Sim
mmu-mir-6383	-1,64	5,62E-05	0,0005	Falsa	Não
mmu-miR-7578	-4,64	0,0005	0,0022	Verdadeira	Não

Fold 3					
#ID transcrito	Fold Change	P-val	FDR P-val	Expressão nos dois grupos	Homologia com humanos
mmu-miR-299a-3p	-5,17	3,82E-07	1,22E-05	Verdadeira	Não
mmu-miR-6962-5p	-5,01	2,12E-06	3,93E-05	Verdadeira	Não
mmu-miR-7578	-4,64	0,0005	0,0022	Verdadeira	Não
mmu-miR-7223-5p	-4,33	4,41E-08	2,79E-06	Verdadeira	Não
mmu-miR-467g	-4,12	0,001	0,0041	Verdadeira	Não
mmu-miR-1902	-4,09	0,0018	0,0061	Verdadeira	Não
mmu-miR-135a-2-3p	-3,98	4,13E-08	2,75E-06	Verdadeira	Sim
mmu-miR-181d-3p	-3,15	2,59E-05	0,0002	Verdadeira	Sim
mmu-miR-16-2-3p	-3,13	0,0031	0,0097	Verdadeira	Sim
mmu-miR-29b-2-5p	-3,01	0,0025	0,008	Verdadeira	Sim

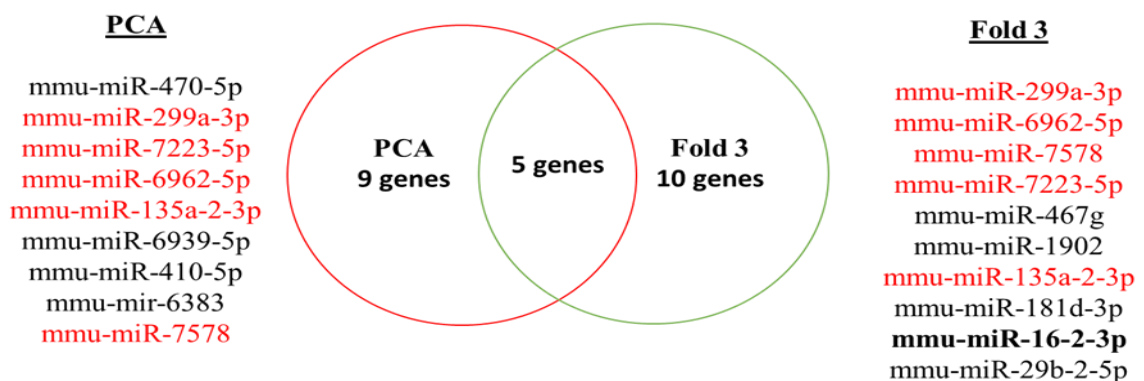


Figura 29: Figura ilustrativas demonstrando os genes que foram selecionados pelas análises de PCA e fold3.

Muitos dos microRNAs selecionados eram transcritos com numeração alta, por exemplo mmu-miR-7223-5p. Esse tipo de transcrito pode revelar aleatoriedade das leituras do *chip* do microRNA-*array*, uma vez que muitas dessas sequencias são preditas por algoritmos de acordo com possíveis sequências *stem-loop*, tamanho e posição genômica entre outros fatores, mas isso não determina a existência desse gene e tão pouco seu valor biológico (103). Dessa forma,

usamos um novo critério de exclusão, os genes selecionados por análises de PCA ou fold3 deveriam apresentar trabalhos publicados confirmando sua expressão ou apresentar ortologia para humanos (dessa forma, garantindo que nosso trabalho não ficasse específico para fisiologia de camundongos balb/c), para tal utilizamos as plataformas de PUBMED para procura de artigos e miRBase para confirmar a ortologia.

Após a aplicação desse novo critério restaram 6 microRNAs para validação (2 selecionados com PCA e fold3 [miR-299a-3p e miR-135a-2-3p], 1 por PCA [miR-410-5p] e 3 por fold3 [miR-181d-3p; miR16-2-3p e miR-29b-2-3p]).

O próximo passo foi verificar os genes que são alvos preditos para esses 6 microRNAs, para isso utilizou-se a plataforma miRWalk 3.0. Nessa plataforma ao fornecer transcrito/microRNA se obtém uma lista de genes alvos e uma classificação de números de pares de base que podem apresentar ligação na região *seed* entre o gene e o microRNA (score de ligação). Entretanto, não foi usado o score de ligação para selecionar genes alvos, no lugar utilizou-se outro filtro que consistia em cruzar a lista de genes preditos para cada microRNAs com uma lista de transcriptoma obtida no trabalho “*Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors*” – Zhong *et al*, 2020 (104). Essa lista de transcriptoma utilizou 3 amostras de células CT26 e 2 amostras de tumores CT26, com essa biblioteca utilizada pelos pesquisadores foi possível obter todos os genes expressos nessas amostras em escala de transcrito por milhão (TPM). Esse filtro se justifica pois dessa forma foi possível cruzar os genes preditos pela plataforma miRWalk com genes que realmente são expressos em amostras semelhantes com as desse trabalho. Utilizou-se o critério de apenas aceitar genes que tivessem um valores superiores a 3 TPM.

Na sequência, os genes selecionados foram inseridos na plataforma Enrichr, dessa forma foi possível obter principais vias que os genes alvos de cada microRNA participam. Utilizou-se duas bases de dados GO (*gene ontology*) – função molecular- 2021 e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) – 2021. A plataforma Enrichr também fornece uma análise estatística que determina as vias mais influentes de acordo com o conjunto de genes submetidos a análise. Usou-se como critério de seleção vias que tivessem $p < 0,05$, ainda a disposição das vias nos gráficos está posta pelo o *score combinado* uma análise matemática da plataforma Enrichr que combina dados de *p*-valor e FDR para determinar as vias que mais são influenciadas pelo conjunto de genes analisados (Figuras 30-35).

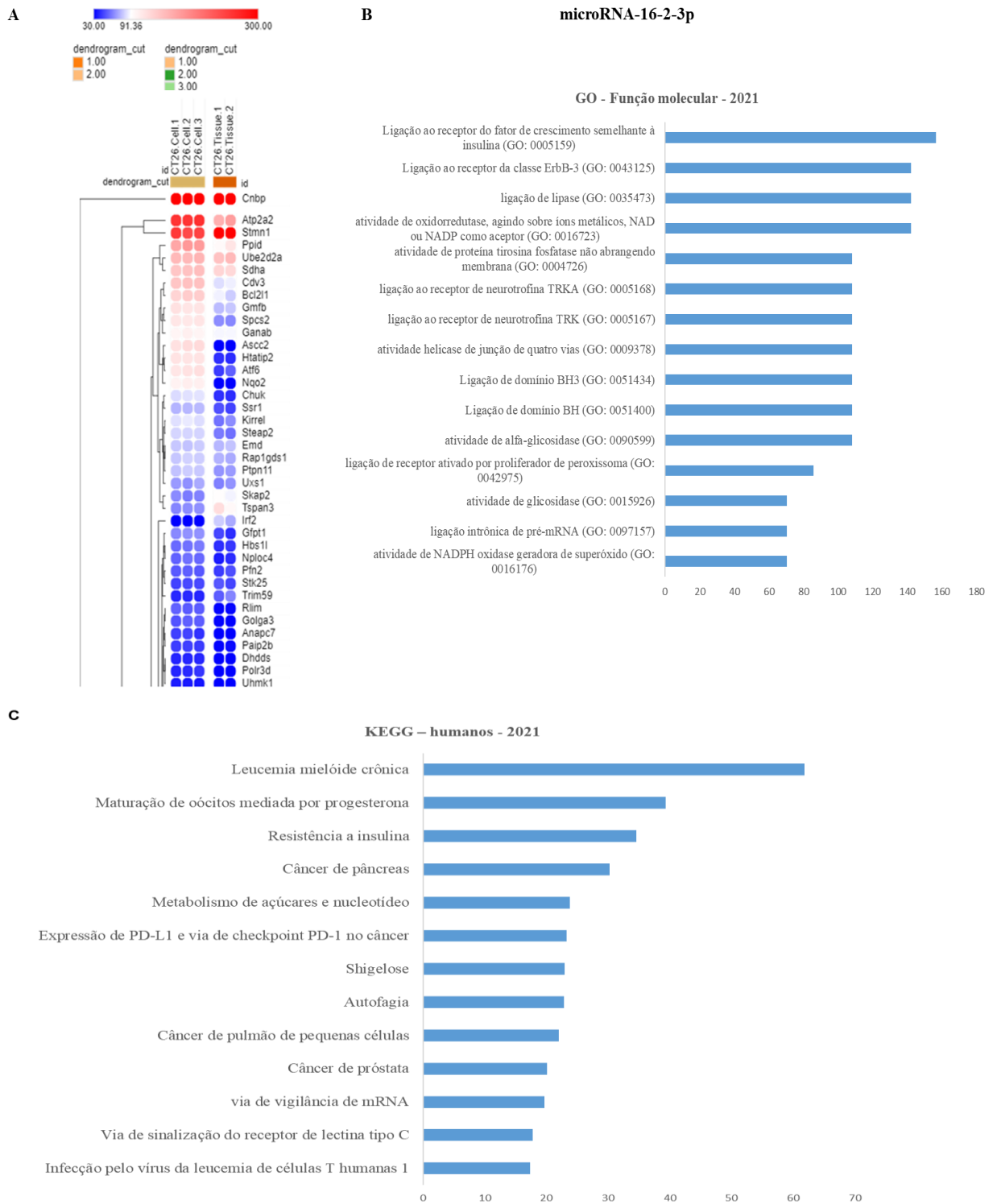


Figura 30: Figura ilustrativa demonstrando A) genes alvos do microRNA-16-2-3p mais expressos no transcriptoma (104); B) vias predominantes na plataforma GO-função muscular (score combinado); C) vias predominantes na plataforma KEGG-2021 (score combinado).

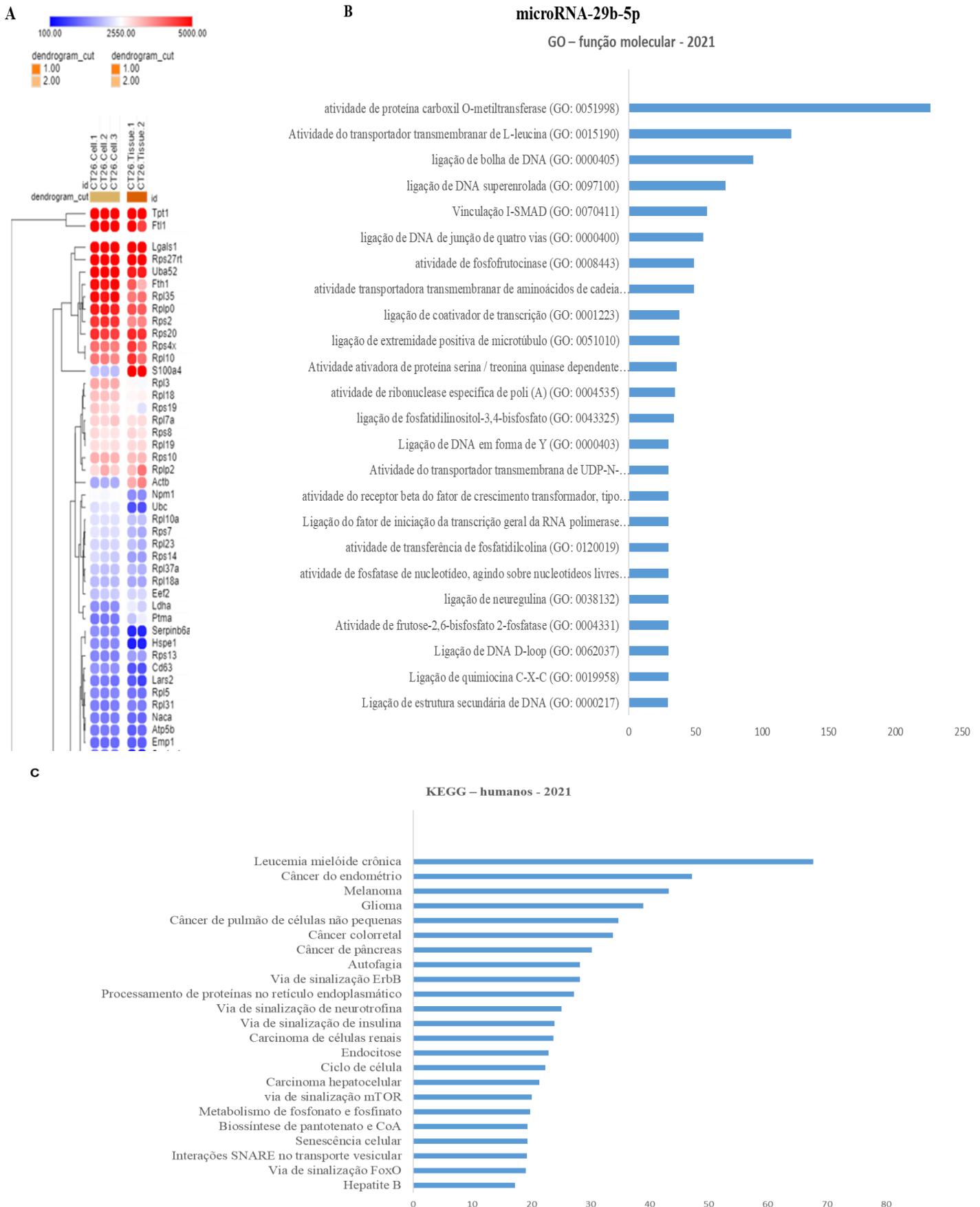


Figura 31: Figura ilustrativa demonstrando A) genes alvos do microRNA-29b-5p mais expressos no transcriptoma (104); B) vias predominantes na plataforma GO-função muscular (score combinado); C) vias predominantes na plataforma KEGG-2021 (score combinado).

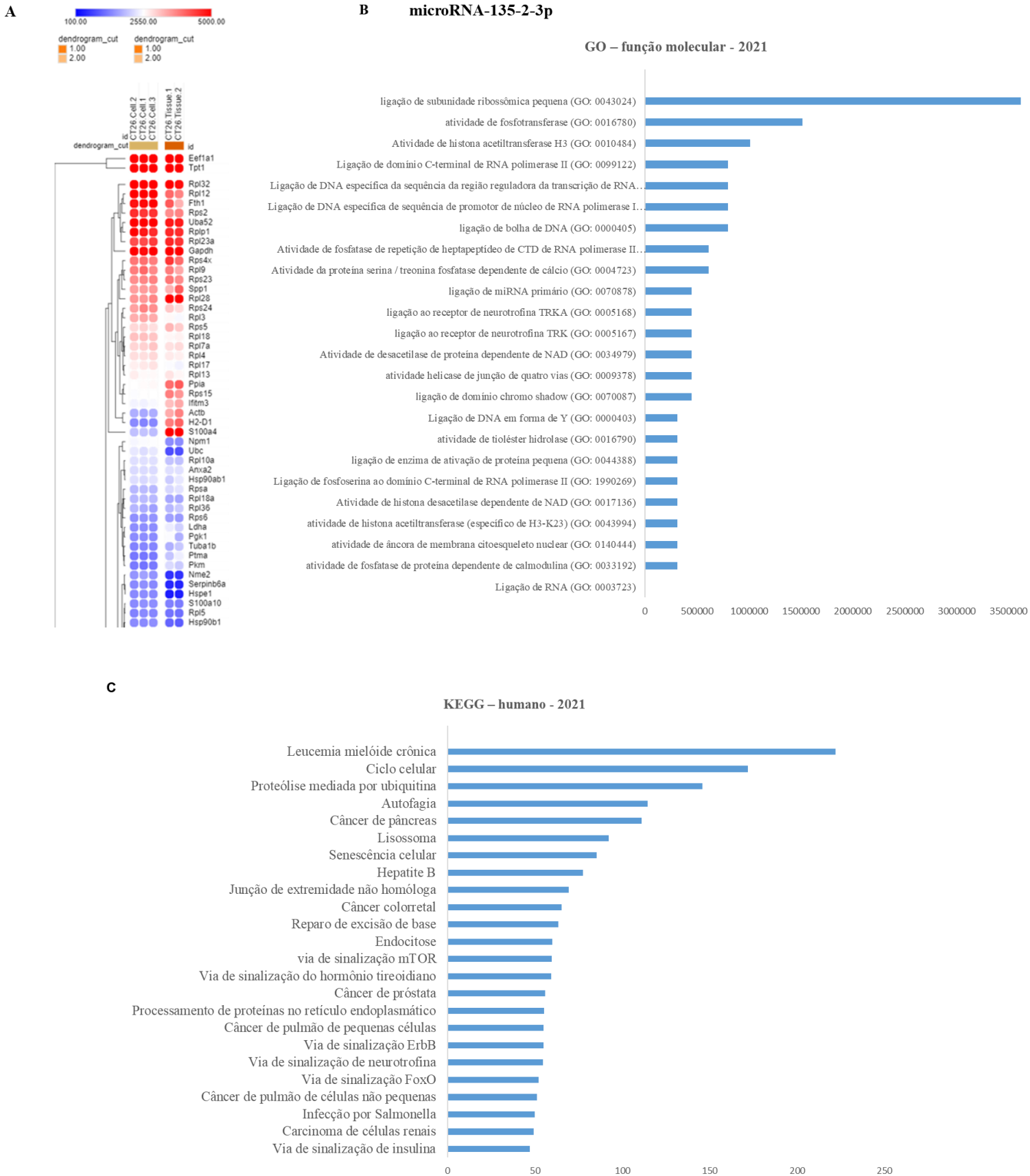


Figura 32: Figura ilustrativa demonstrando A) genes alvos do microRNA-135-2-3p mais expressos no transcriptoma (104); B) vias predominantes na plataforma GO-função muscular (score combinado); C) vias predominantes na plataforma KEGG-2021 (score combinado).

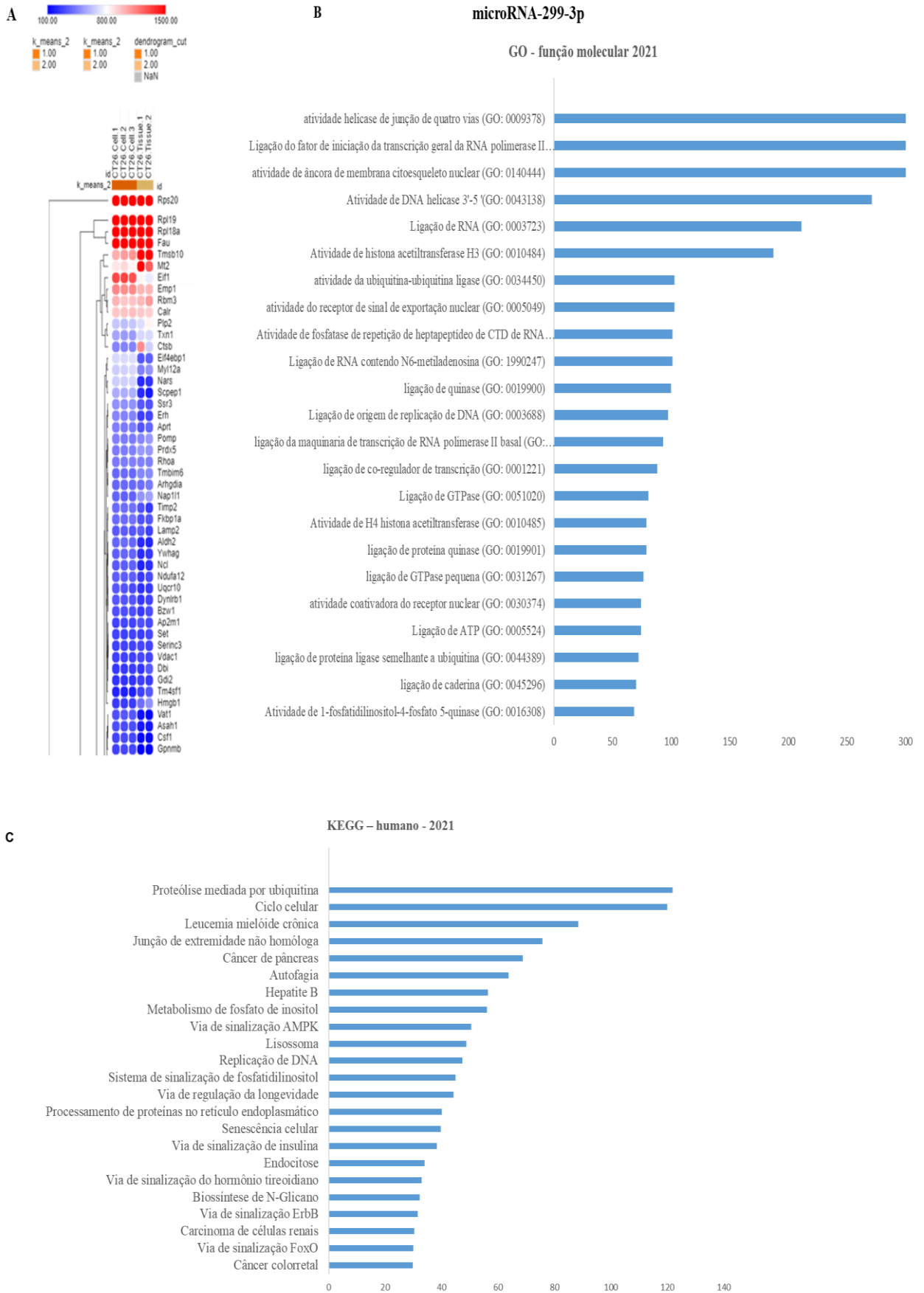


Figura 33: Figura ilustrativa demonstrando A) genes alvos do microRNA-299-3p mais expressos no transcriptoma (104); B) vias predominantes na plataforma GO-função muscular (score combinado); C) vias predominantes na plataforma KEGG-2021 (score combinado).

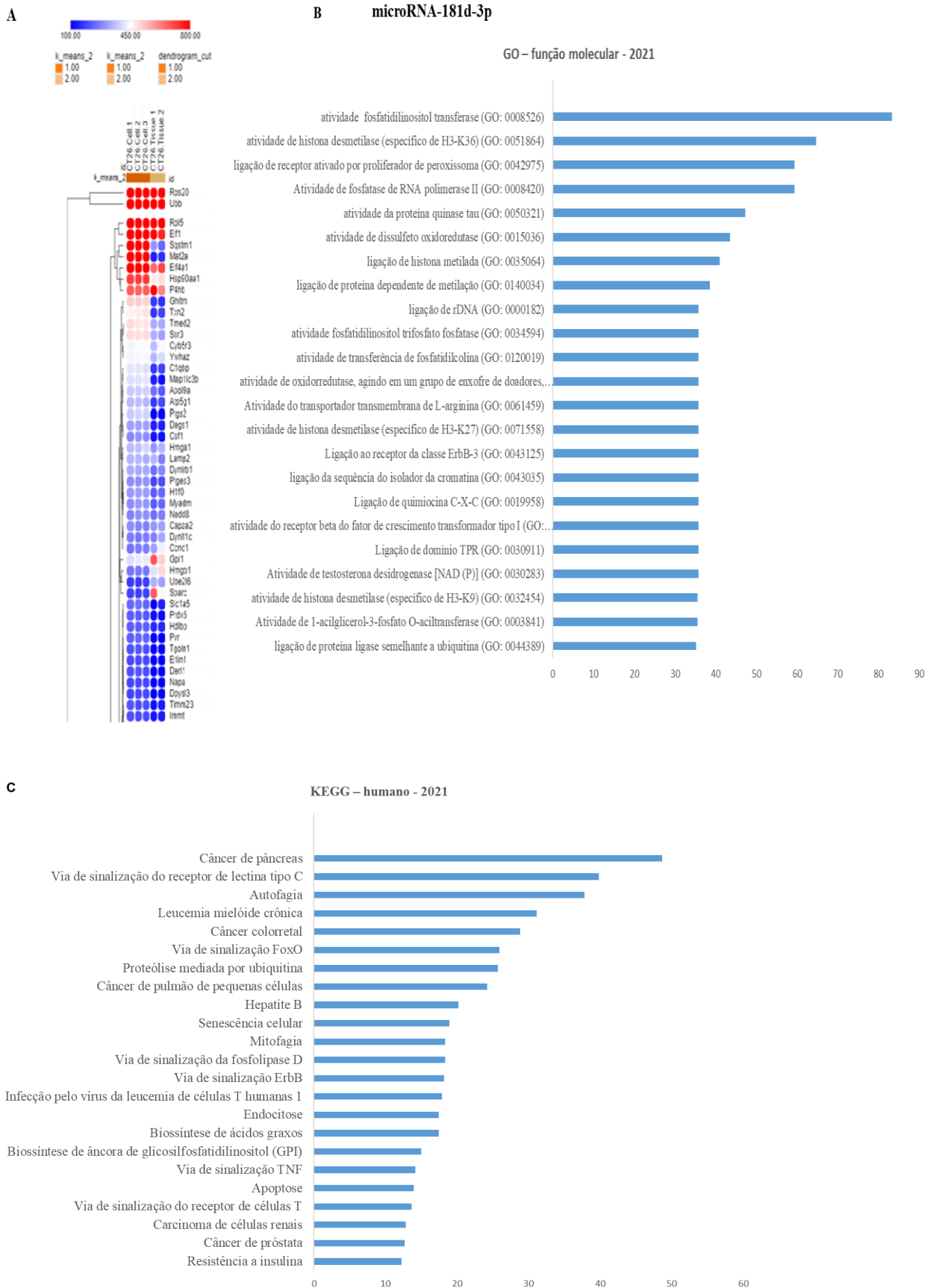


Figura 34: Figura ilustrativa demonstrando A) genes alvos do microRNA-181d-3p mais expressos no transcriptoma (104); B) vias predominantes na plataforma GO-função muscular (score combinado); C) vias predominantes na plataforma KEGG-2021 (score combinado).

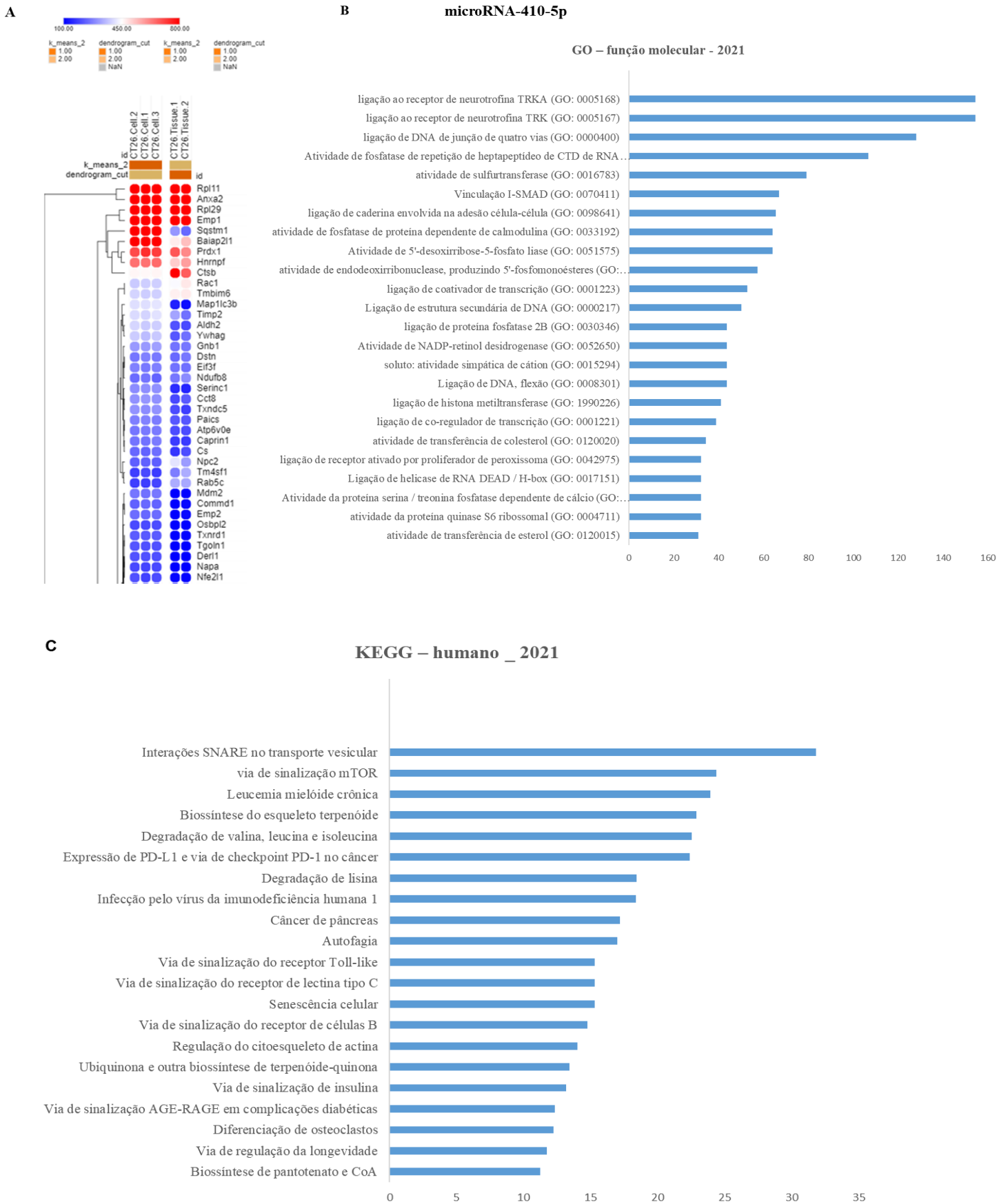


Figura 35: Figura ilustrativa demonstrando A) genes alvos do microRNA-410-5p mais expressos no transcriptoma (104); B) vias predominantes na plataforma GO-função muscular (score combinado); C) vias predominantes na plataforma KEGG-2021 (score combinado)

Após as análises bioinformáticas se fez necessário confirmar a expressão dos microRNAs e seus genes alvos. Dos 6 microRNAs selecionados nas análises apenas o microRNA-16-2-3p apresentou amplificação por PCR. Esse microRNA apresentou expressão diminuída no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26 (figura 36), esse resultado confirma os dados obtidos no *microRNA-array*.

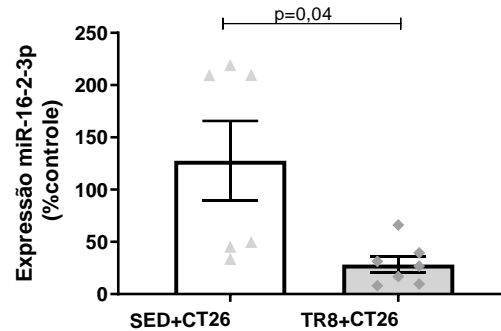


Figura 36: Expressão do microRNA-16-2-3p (% do controle). SED+CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas.

Dessa forma, deu-se seguimento as análises dos genes alvos do microRNA-16-2-3p, as vias que selecionamentos estavam principalmente relacionadas com a pergunta alvo desse trabalho, as vias selecionadas foram, i) Metabolismo de piruvato; ii) Ciclo do ácido cítrico; iii) Via de sinalização de p53; iv) Metabolismo de frutose e manose; v) Via de sinalização de PI3K-AKT; vi) Via de sinalização cAMP e vii) Via de sinalização mTOR. Salienta-se, que há possibilidades de continuar essa investigação baseando-se nas vias mais relevância de *score combinado* e *p*-valor, possibilitando encontrar outros mecanismos moleculares em tumores CT26 que não se relacionam diretamente com o metabolismo celular.

Selecionou-se os genes que influenciam as vias citadas acima, a saber: PIK3CA; AKT2; PIK3R1; CAMK2D; PFKFB3; ANGPT1; RPS6KB1; INSR; BCL2; ELOC e IGF1R. Essa lista de genes foi submetida a análise na plataforma miRNet (<https://www.mirnet.ca/>) para avaliar se os genes se relacionam entre si em cascatas de sinalizações. Essa análise agrupa os genes em *clusters* de acordo com a proximidade e relação das cascatas de sinalizações que os mesmos participam. Os genes selecionados e submetidos para análise foram divididos em dois *clusters*. Esses dados apontam que as vias e genes selecionados apresentam uma forte interrelação.

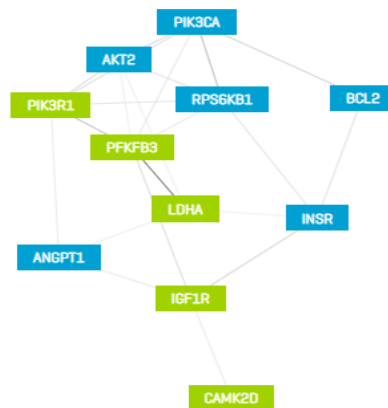


Figura 37: Figura ilustrativa demonstrando a formação de *clusters* com genes alvos do microRNA-16-2-3p selecionados para confirmação por PCR.

O passo seguinte foi analisar a expressão dos genes relacionados com as vias descritas acima. As análises de PCR mostraram que nenhum dos genes selecionados apresentaram alteração na expressão em função do treinamento físico (Figura 38 A-F).

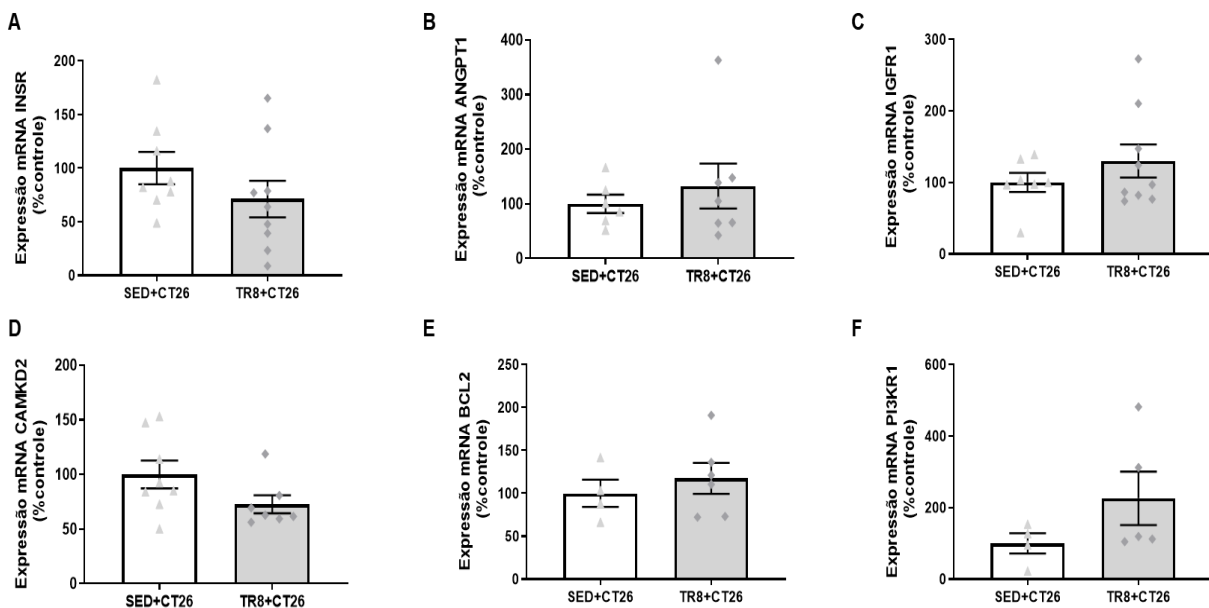


Figura 38: Expressão gênica de A) INSR (% do controle); B) ANGPT1 (% do controle) C) IGF1R (% do controle), D) CAMK2D (% do controle); E) BCL2 (% do controle) e F) PI3KR2 (% do controle). Sed+CT26 grupo câncer de cólon CT26 sedentário; TR8+CT26 = grupo câncer de cólon CT26 treinado previamente por 8 semanas

7 Discussão;

No presente trabalho demonstrou-se que o TFA contribui de forma eficiente para a diminuição do volume tumoral em camundongos inoculados com células CT26. Foi observado que TFA diminui a expressão de mRNAs e proteínas relacionadas com o metabolismo glicolítico,

destaca-se a diminuição da expressão gênica e proteica de HIF1a, e a diminuição da concentração de lactato nos tumores dos animais treinados. Ainda o TFA aumentou a sobrevida e impediu prejuízos severos na capacidade aeróbica dos animais. Esses dados em conjunto dão bons indicativos dos potenciais benefícios da prática de atividade física no tratamento do câncer.

A seguir os resultados serão discutidos com maior profundidade.

Observou-se que todos os animais que foram submetidos ao TFA apresentaram menor crescimento tumoral comparado com animais sedentários, independentemente do tempo do protocolo de treinamento. Esses dados conflitam parcialmente com a hipótese desse trabalho. Hipotetizou-se que o maior tempo de treinamento levaria a menor progressão tumoral; também, que o treinamento após a inoculação das células tumorais não seria eficiente para prevenir o crescimento do tumor.

Pedersen e colaboradores demonstraram que camundongos treinados por quatro semanas prévias ao inóculo de células B16 (melanoma) apresentaram menor crescimento tumoral comparados com o controle. Entretanto, o treinamento após o inóculo não diminuiu o crescimento tumoral (13). Dessa forma, nossos dados também conflitam com resultados já observados na literatura, apesar de serem modelos distintos de tumores. No entanto, esse resultado nos possibilita um maior campo de investigação no futuro.

Decidimos conduzir o estudo com os animais treinados previamente por oito semanas porque esse foi o grupo que melhorou o desempenho físico no teste de esforço máximo ao final do protocolo de treinamento. Além disso o teste máximo também foi interpretado como um marcador da eficiência do protocolo de TFA.

Avaliou-se o consumo de ração e excreção de fezes a fim de investigar se os animais com câncer se alimentavam de forma semelhante a animais saudáveis. Observou-se que não há diferença na alimentação e excreção dos animais em decorrência do câncer ou do TFA. Dessa forma, esse resultado em específico é importante para o trabalho pois dá subsídios aos demais resultados, uma vez que fica demonstrado que alteração de mecanismos moleculares relacionadas ao metabolismo tumoral não estão associadas a prejuízos na ingestão energética.

Sendo assim, investigou-se a expressão gênica das sirtuínas e de outros mRNAs relacionados com o metabolismo central de carbono. As sirtuínas analisadas no presente estudo foram SIRT1 e SIRT6, caracteristicamente presentes no núcleo e com função de deacetilar histonas e, dessa forma, reprimir a transcrição gênica (8,9). Também foi analisada a expressão da SIRT3 que é comumente encontrada em mitocôndrias e está associada com o metabolismo oxidativo (105). Evidências apontam que SIRT1 e SIRT6 podem controlar o metabolismo oxidativo através da deacetilação de histonas em regiões que reprimem a transcrição de genes

que codificam enzimas glicolíticas (8,9). Além disso, SIRT3 e SIRT6 também são caracterizadas por inibir a função de HIF1 α levando a diminuição do metabolismo glicolítico (105).

Não foram encontradas diferenças significantes na expressão gênica de SIRT1, SIRT3 e SIRT6. A investigação das sirtuínas nesse trabalho esteve embasada em dados de um estudo piloto do nosso grupo que demonstravam que havia um aumento da expressão gênica de SIRT6 em camundongos treinados e inoculados com células CT26. Acreditamos que há divergência de resultados pois apesar dos desenhos experimentais das duas investigações serem semelhantes os protocolos foram distintos. Nos dados anteriores a essa tese foram inoculadas 1×10^6 células CT26 nos camundongos, essa concentração de células gerava um fenótipo de câncer bastante agressivo nos animais (mudança de pelagem, perda de peso, perda de massa muscular, perda de massa gorda e com morte iminente e forçava que a eutanásia dos camundongos fosse realizada entre 13 e 16 dias após o inóculo das células. Os animais do presente estudo foram inoculados com 1×10^5 células CT26, essa concentração de células por sua vez proporcionou maior intervalo entre o inóculo e a eutanásia, além de gerar fenótipo menos agressivo do câncer. Outro fator importante foi que no presente estudo, os animais sofreram eutanásia com volumes tumorais entre 400mm^3 e 600mm^3 , já os animais do estudo prévio foram eutanasiados sem um padrão no volume tumoral, com valores mais próximos a 1cm^3 . Além disso, nos dados prévios a diferença do volume tumoral de animais sedentários comparado com treinados era largamente maior, possivelmente ampliando uma possível influência na expressão gênica da SIRT6. Portanto, deve ser considerado o fato de que a concentração de células inoculadas foi diferente entre o estudo atual e o estudo anterior e esse fator desencadeou respostas também divergentes. No estudo anterior observamos uma resposta heterogênea do volume tumoral, o que pode ter influenciado nas diferenças na expressão de SIRT6 entre animais treinados e sedentários. Nos animais que foram eutanasiados com volumes tumorais menores e com maior homogeneidade, não houve alteração na expressão gênica de SIRT6.

Corroborando com esse resultado não foram observadas diferenças na expressão dos microRNAs alvos para SIRT6. Sugerindo que se o TFA exerce influência no controle pós-transcricional na expressão da SIRT6 não se deve ao controle da expressão dos microRNAs-33a-3p, -23a-3p e -24-3p.

A expressão proteica de SIRT6 também não foi diferente entre os grupos. A avaliação por imuno-histoquímica mostrou uma menor marcação da expressão de SIRT6 nos animais do grupo treinado. Embora tenham sido feitas várias tentativas de otimizar a metodologia, ainda assim não foi possível retirar as marcações inespecíficas do anticorpo, o que dificultou uma análise mais acurada do resultado. Dessa forma, pelo conjunto de análises acreditamos que o eixo microRNA-

33a-p/ SIRT6 não sofre influência do TFA. Sendo assim, as alterações que foram encontrados no metabolismo tumoral estão relacionadas com outras vias moleculares.

Nesse sentido, a expressão gênica, proteica e as marcações histológicas de HIF1 α estavam diminuídas em decorrência do TFA. Ainda, as demais alterações encontradas no trabalho são associadas com a expressão de HIF1 α .

HIF1 α é um gene expresso em resposta a hipóxia nos tecidos, ele age com um fator pós-transcricional e faz a mediação de um grande número de genes e também microRNAs. (88). Em grande parte dos tumores sólidos há uma perda da funcionalidade e da estrutura dos vasos sanguíneos apesar de aumento de fatores angiogênicos, esse processo gera prejuízos no aporte sanguíneo resultando em áreas de hipóxia no tumor (14,56).

A falta de aporte sanguíneo adequado e as áreas de hipóxia promovem ineficiência do sistema imune, resistência a terapias medicamentosas anticâncer e alteração no metabolismo central de carbonos (14). Por outro lado, o TFA é conhecido por promover aumento da angiogênese nos tecidos, principalmente dos tecidos musculares (106). A angiogênese gerada pelo TFA é associada com aumento da expressão de VEGF como também diminuição da expressão de HIF1 α e é bem caracterizada por aumentar a funcionalidade dos tecidos e o aporte sanguíneo (107). Nesse contexto, evidências recentes apontam que o TFA também aumenta a angiogênese em tumores sólidos, entretanto o TFA também aumenta a densidade e a perfusão vascular, dessa forma aumentando o aporte de oxigênio, esses achados estão intimamente relacionados com melhora da entrega de drogas anticâncer no tumor e com o acesso de células do sistema imune no tumor (14).

HIF1 α também controla a expressão de genes relacionados com o metabolismo central de carbono. Um desses genes é GLUT1, um transportador de glicose presente na membrana celular de tecidos como cérebro, olhos, células embrionárias e tumores sólidos e age independente de insulina. Esses tecidos têm como uma das características em comum a alta atividade metabólica e consumo de glicose. Neste estudo encontramos uma tendência a diminuição da expressão desse gene nos tumores de animais treinados comparado com animais sedentários (P=0,07). Esse resultado está em acordo com a literatura, que mostra que a expressão de GLUT1 é aumentada em diversos tipos de neoplasia, proporcionando maior aporte de glicose e maior sobrevivência para células tumorais (32). Liu e colaboradores demonstraram que a inibição de GLUT1 em modelo *in vitro* de leucemia levava a menor captação de glicose pelas células e diminuía a viabilidade e proliferação celular. A inoculação dessas células com inibição de GLUT1 em animais proporcionava um fenótipo menos agressivo comparado com o controle, onde apresentava diminuição do tamanho do baço e proliferação celular (32).

Uma vez que encontramos diminuição da expressão de HIF1 α e uma tendência de diminuição de GLUT1 nos tumores de animais treinados, passamos a avaliar a expressão gênica de enzimas chaves da glicólise.

HK1 é uma enzima que catalisa a primeira reação da glicólise, a conversão de glicose para glicose-6-fosfato. Esta reação é irreversível, além disso o produto glicose-6-fosfato também pode ser considerado substrato para a via das pentoses-fosfato. Estudos em tumores com mutações do gene p53 foi observado que a HK1 é transativada levando ao aumento da atividade da via glicolítica (31). Ainda evidências apontam que hepatocarcinomas, em modelos animais, apresentam aumento da expressão de HK1 e este fenômeno contribui para a iniciação tumoral (6).

No nosso trabalho não encontramos diferença na expressão de HK1 comparando os dois grupos. Também, não foram observados efeitos na captação de glicose. Avaliou-se o produto glicose-6-fosfato em tumores e células primárias e não foi encontrado diferença entre os grupos treinados sedentários.

Avaliamos a expressão de PFK1, mas não observamos diferença entre os grupos. PFK1 uma enzima reguladora da via glicolítica que catalisa a reação de conversão frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato com o consumo de uma molécula de ATP. Essa é considerada uma das mais importantes reações da glicólise por ser irreversível e, também, porque o produto, frutose-1,6-bifosfato, passa a ser substrato somente de reações que ocorrem na via glicolítica e não pode ser utilizado na via das pentoses-fosfato e para formação de glicogênio. Além disso, PFK1 é ativada e inibida por diversos fatores alostéricos, sendo assim essa enzima é considerada como um importante regulador da glicólise. Não foi observado alteração na formação de frutose-6-fosfato nos tumores.

Também avaliamos a expressão de PKM1 e PKM2 que são isoenzimas que tem a função de catalisar a última reação da glicólise que é a conversão de fosfoenolpiruvato a piruvato, essa reação ainda é responsável por gerar uma molécula de ATP. A expressão das isoformas é condicionada a cada tecido, PKM1, por exemplo, é mais expressa em tecidos com altas taxas de proliferação e síntese de nucleotídeo, tal como tumores (51). No nosso trabalho nós não encontramos diferença da expressão desses genes entre os grupos. A nossa motivação para analisar esses dois genes deve-se ao fato de que essas duas isoformas apresentam comportamento distintos em tumores. Morita e colaboradores demonstraram que a deleção de PKM2 e KRAS em camundongos levava a maior tumorigênese no pulmão e maior expressão de PKM1 nesses tumores, os pesquisadores também demonstraram *in vivo* e *in vitro* que a alta expressão de PKM1

está relacionada com o maior catabolismo da glicose, aumento da autofagia e da malignidade do tumor (51).

A PDHa é uma subunidade que compõe o complexo piruvato desidrogenase. Por sua vez, essa enzima tem a função de converter o produto final da glicólise o piruvato em acetil-COA, este processo ocorre na matriz mitocondrial e representa a primeira reação que dá origem a oxidação de produtos de carbono provenientes da glicólise e tem como resultado final a produção de energia através do ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória de elétrons. Escolhemos analisar a expressão gênica dessa enzima, para nos dar indícios se há diferença no catabolismo da glicose, uma vez que já estávamos observando a diferença na expressão de genes relacionados com a captação e primeiras reações da glicólise.

Uma vez que não observamos diferença na expressão de PDHa, passamos a analisar dois outros genes. 1) PDK1, uma enzima que tem como principal ação inativar a enzima piruvato desidrogenase através de fosforilação e consumo de ATP. Sendo assim, a alta expressão de PDK1 causa inibição da oxidação de piruvato na mitocôndria e conseqüentemente leva ao aumento da conversão de piruvato a lactato no citoplasma. 2) LDHa, uma isoforma da enzima LDH, o conjunto de isoformas de LDH catalisam a conversão de piruvato em lactato.

A alta produção de lactato em tumores é algo bem conhecido e muitos trabalhos mostram que esse produto está relacionado com a reprogramação metabólica e aumento da malignidade de diversos tipos de câncer (4,32). A expressão de LDHa é alta em tumores sólidos comparada com tecidos normais, a expressão aumentada dessa enzima em tumores está associada com alterações no metabolismo celular que vão além da maior produção de lactato, por exemplo, essa enzima auxilia nos processos de invasão e metástase aumentando a malignidade da doença (4,32). Os resultados encontrados, neste estudo, mostram diminuição da expressão de PDK e LDHa em tumores de camundongos treinados. Também, se observou menor produção de lactato nos tumores de animais treinados.

Uma vez que encontramos essas alterações na expressão de genes, que estão relacionados com a captação de glicose (GLUT1) e com as reações finais da glicólise (PDK1 e LDHa), passamos a observar o consumo de oxigênio das células tumorais CT26 de animais treinados e sedentários, com a finalidade de observar o comportamento do metabolismo. Para isso colocamos em cultura, células tumorais provenientes dos grupos Sed+CT26 e TR8+CT26. Os resultados mostraram que OCR e ECAR é menor em células provenientes do grupo treinado, portanto a partir desses dados também observamos que há uma menor respiração mitocondrial e capacidade glicolítica nas células vindas do grupo treinado. Esses resultados são inéditos, entretanto vão de encontro aos efeitos do TFA já observados em outros tecidos, por exemplo no músculo

esquelético (108). O TFA é conhecido por aumentar a atividade mitocondrial e aumentar a capacidade oxidativa (108).

Ainda, foi avaliada a expressão dos genes que codificam as enzimas que compõe as oito reações do ciclo do ácido cítrico. Entretanto, foi observado que apenas IDH2 teve a expressão alterada em decorrência do TFA, esse gene apresentou diminuição da expressão no grupo TR8+CT26 comparado com o grupo SED+CT26.

Existem cinco isoformas de IDHs, essas enzimas catalisam a descarboxilação oxidativa do isocitrato em 2-oxoglutarato. Essas enzimas pertencem a duas subclasses distintas, uma das quais utiliza NAD^+ como aceptor de elétrons e a outra NADP^+ . A proteína codificada pelo gene IDH2 é a isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ encontrada nas mitocôndrias e desempenha papel na produção de energia, por ser uma das enzimas regulatórias da via oxidativa (109).

Em tumores, o gene IDH2 apresenta um papel ainda pouco conhecido. Li e colaboradores, utilizaram um banco de dados de mais de 1000 tumores humanos de câncer de pulmão, e observaram que a expressão aumentada de IDH2 era um mau prognóstico e estava relacionada com o aumento da mortalidade. Os pesquisadores ainda utilizaram modelos animais xenográficos de câncer de pulmão, e observaram que o aumento da expressão de IDH2 levava a diminuição da ubiquitinação de HIF1 α . Dessa forma, apesar de ser um componente do ciclo do ácido cítrico, o aumento da expressão de IDH2 leva ao aumento da atividade da glicólise através de HIF1 α e contribui para malignidade da doença (109). Li e colaboradores, utilizaram drogas para diminuir a expressão de IDH2 e observaram diminuição da expressão de HIF1 α . Neste trabalho há uma similaridade, onde o TFA leva a menor expressão de IDH2 e HIF1 α concomitantemente.

Avaliou-se a expressão proteica dos complexos mitocôndrias responsáveis pelas reações de OXPHOS, observou-se que o complexo II (SDHb) apresentava diminuição no grupo TR8+CT26. Dos cinco complexos mitocondriais, SDHb é o único complexo que tem componentes que também participam do ciclo do ácido cítrico, dessa forma a expressão gênica da mesma já havia sido investigada e mostrou-se com tendência de diminuição em virtude do TFA. Entretanto, nesse trabalho não se observou alteração na respiração celular por respirômetro de alta resolução.

Em células tumorais é comum encontrar mutações nas isoformas de SDH, dessa forma o succinato pode se acumular na mitocôndria e no citosol e inibir a enzima prolil hidroxilase. A inibição de prolil hidroxilase torna as células resistentes aos sinais apoptóticos e/ou ativam uma resposta hipóxica ocasionada pelo aumento da expressão de HIF1 α (110). Nosso trabalho mostra que a expressão de SDHb é diminuída em decorrência do TFA, como também é diminuída a

expressão de HIF1 α , dessa forma nossos dados indicam a menor atividade do ciclo do ácido cítrico e de OXPHOS, sem uma aparente resposta de maior captação de glicose através de HIF1 α .

Os resultados apresentados se assemelham aos dados de Lu e colaboradores, em tumores sólidos provenientes de pacientes com câncer de pulmão. Os pesquisadores observaram que o TFA leva a diminuição da produção de ATP através da diminuição de produtos da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico (35). A literatura também aponta que a agressividade dos tumores está relacionada com a sua capacidade de produção energética. Células de câncer de mama altamente metastáticas apresentam alta capacidade glicolítica e de respiração mitocondrial, comparada com células com perfil menos agressivo (53).

O presente trabalho também teve como objetivo uma análise de larga escala para encontrar microRNAs que estivessem relacionados com o metabolismo tumoral e que sofressem influência do TFA.

As análises de microRNA-*array* deram novas perspectivas para o trabalho. Apesar de ainda carecer de mais investigações a seleção e confirmação por PCR do microRNA-16-2-3p é um resultado de grande relevância. O microRNA-16-2-3p é a fita "passageira" do microRNA 16-5p, que é originado de 2 *locis* gênicos, o cromossomo 13 (MIR-16-1) e cromossomo 3 (MIR-16-2). Embora os loci MIR-16-1 e MIR-16-2 codifiquem o microRNA-16-5p, eles codificam diferentes fitas "passageiras", o microRNA-16-1-3p e microRNA-16-2-3p (111).

As funções do microRNA-16-2-3p não são profundamente conhecidas na literatura. O trabalho de Maximov e colaboradores demonstrou que a superexpressão do microRNA-16-2-3p leva a menor migração e proliferação de células de osteosarcomas em cultura, esses dados se relacionam com diminuição de potencial metastático. Entretanto, o trabalho não confirma diferença de expressão do microRNA-16-2-3p por PCR entre um tecido saudável e tumores de osteosarcoma. O estudo de Han e colaboradores apresenta resultados semelhantes, diminuição de migração e proliferação de células em cultura de células mesenquimais primordiais maxilares (112). Os dados encontrados no presente estudo não corroboram esses dados da literatura, entretanto, salienta-se que existem apenas dois trabalhos mostrando o papel desse microRNA. No nosso trabalho, confirmamos por PCR a diminuição da expressão desse microRNA em tumores de animais treinados. Pelos dados apresentados até aqui consideramos que o TFA exerce ação terapêutica, dessa forma se faz necessário uma investigação mais criteriosa do papel do microRNA-16-2-3p nesse cenário. Dos alvos do microRNA-16-2-3p que investigamos até o momento, não encontramos diferença na expressão dos genes alvos que escolhemos analisar.

O conjunto dos dados mostram que o TFA leva a menor progressão tumoral. A hipótese inicial do trabalho não foi confirmada e foi demonstrado que o TFA não altera o eixo microRNA-

33a-3p e a proteína SIRT6, por outro lado observou-se que o TFA exerce influência em outras vias relacionadas com o metabolismo tumoral. O principal achado foi a diminuição da expressão de HIF1 α , esse gene é largamente conhecido como um regulador do metabolismo glicolítico e evidências mostram o papel do mesmo na tumorigênese e malignidade do câncer. Observou-se diminuição da expressão PDK1 e LDHa resultando na menor produção de lactato nos tumores de animais treinados. De acordo com a literatura o aumento da expressão desses genes e de lactato é um mau prognóstico no câncer e está relacionado com aumento de proliferação e crescimento de células tumorais. Dessa forma, os achados desse trabalho são importantes pois mostram que o TFA altera o metabolismo tumoral de modo a contribuir para o menor crescimento tumoral e aumento da sobrevida.

7.1 Considerações sobre o andamento do projeto e próximos passos;

A pandemia da COVID19 gerou um grande prejuízo ao andamento do projeto. Entretanto, ao longo dos quatro anos houve avanços nas investigações, muitos dados tiveram caráter inédito e relevante. Buscou-se testar a hipótese que o TFA altera o metabolismo tumoral e consequentemente afeta o crescimento tumoral. Os ensaios mostram que diversos genes relacionados ao metabolismo e que são marcadores de proliferação e crescimento no câncer estavam diminuídos em decorrência do TFA. O principal deles foi HIF1 α , demonstrou-se por expressão gênica, proteica e histologia que HIF1 α tinha expressão diminuída em decorrência do TFA. Esse gene é considerado um regulador de diversos processos células, inclusive a glicólise como já mencionado na discussão. Existem diversas publicações demonstrando o papel de HIF1 α no câncer, entretanto são poucas que mostram a influência do TFA sobre a expressão desse gene. Pelo caráter inédito e relevante desse achado, o grupo aposta em uma publicação substancial. O artigo está em preparação. Os dados do *microRNA-array* também tem um caráter inédito, mas carecem de maior investigação da ação do *microRNA-16-2-3p*, pela sua inibição e super-expressão. Estes experimentos estão sendo realizados para a publicação.

8. Referências;

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*. 2000;100(7):57–70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
3. Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x>
4. Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* [Internet]. 2017;171(2):358-371.e9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.019>

5. Cairns R, Harris I, Mak T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(2):85–95. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2981>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=21258394<http://www.nature.com/nrc/journal/v11/n2/abs/nrc2981.html>
6. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2016;41(3):211–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
7. Deberardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. Review The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. 2008;(January):11–20.
8. Chang H, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2014;25(3):138–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.001>
9. Sebastián C, Zwaans BMM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 Is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*. 2012;151(6):1185–99.
10. Lerrer B, Gertler AA, Cohen HY. The complex role of SIRT6 in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2015;37(2):108–18.
11. Zhong L, Mostoslavsky R. Sirt6. *Transcription* [Internet]. 2010;1(1):17–21. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/trns.1.1.12143>
12. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 α . *Cell* [Internet]. 2010;140(2):280–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.041>
13. Watt MJ, Cheng Y. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids Triglyceride metabolism in exercising muscle ☆. *BBA - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2017;(June):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.015>
14. Pedersen L, Idorn M, Pedersen BK, Straten P, Hojman P, Pedersen L, et al. Short Article Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Short Article Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent. 2016;1–9.
15. Betof AS, Lascola CD, Weitzel D, Landon C, Scarbrough PM, Devi GR, et al. Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2015 May [cited 2016 May 6];107(5):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25780062>
16. Ambros V. microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107(7):823–6.
17. van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing MicroRNA Therapeutics. *Circ Res*. 2012 Feb;110(3):496–507.
18. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiologica*. 2016;
19. Camargo RG, Quintas Teixeira Ribeiro H, Geraldo MV, Matos-Neto E, Neves RX, Carlos Carnevali L, et al. Cancer Cachexia and MicroRNAs. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
20. Chen Y, Gao D-Y, Huang L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Jan;81:128–41.
21. Gomes JLP, Fernandes T, Soci UPR, Silveira AC, Barretti DLM, Negrão CE, et al. Obesity Downregulates MicroRNA-126 Inducing Capillary Rarefaction in Skeletal

- Muscle: Effects of Aerobic Exercise Training. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017(2415246).
22. Silveira AC, Fernandes T, Soci ÚPR, Gomes JLP, Barretti DL, Mota GGF, et al. Exercise Training Restores Cardiac MicroRNA-1 and MicroRNA-29c to Nonpathological Levels in Obese Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;13–6.
 23. Gomes JLP, Tobias GC, Fernandes T, Silveira AC, Negrão CE, Chammas R, et al. Effects of aerobic exercise training on myomirs expression in cachectic and non-cachectic cancer mice. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22):1–19.
 24. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriier NP, Andreo U. miR-33a / b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. 2011;
 25. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2001.
 26. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;
 27. Kreeger PK, Lauffenburger DA. Cancer systems biology: A network modeling perspective. *Carcinogenesis*. 2009.
 28. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*. 2018.
 29. Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biology and Therapy*. 2011.
 30. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010.
 31. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming Growth Factor- Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Mol Cancer Res*. 2008;
 32. Matisse LA, Palmer TD, Ashby WJ, Nashabi A, Chytil A, Aakre M, et al. Lack of transforming growth factor- β signaling promotes collective cancer cell invasion through tumor-stromal crosstalk. *Breast Cancer Res*. 2012;
 33. Budanov A V. Mutant p53 and MDM2 in Cancer. *Subcell Biochem [Internet]*. 2014;85:337–58. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9211-0>
 34. Xiao Z, Dai Z, Locasale JW. Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat Commun [Internet]*. 2019;10(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11738-0>
 35. Lago CU, Sung HJ, Ma W, Wang P, Hwang PM. P53, Aerobic Metabolism, and Cancer. *Antioxid Redox Signal [Internet]*. 2011;15(6):1739–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3151428&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
 36. Liu T, Kishton RJ, Macintyre AN, Gerriets VA, Xiang H, Liu X, et al. Glucose transporter 1-mediated glucose uptake is limiting for B-cell acute lymphoblastic leukemia anabolic metabolism and resistance to apoptosis. *Cell Death Dis*. 2014;5(10):1–13.
 37. Sanderson SM, Locasale JW. Revisiting the Warburg Effect: Some Tumors Hold Their Breath. *Cell Metab [Internet]*. 2018;28(5):669–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.10.011>
 38. Ruiz-Casado A, Martín-Ruiz A, Pérez LM, Provencio M, Fiuza-Luces C, Lucia A. Exercise and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer [Internet]*. 2017;3(6):423–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.007>
 39. Jones LW, Hsu DS, Ashcraft KA, Zessin A, Dewhirst MW, Sanderson SM, et al. Exercise inhibits tumor growth and central carbon metabolism in patient-derived xenograft models

- of colorectal cancer. *Cancer Metab.* 2018;6(1):1–11.
40. Ashcraft KA, Peace RM, Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Efficacy and Mechanisms of Aerobic Exercise on Cancer Initiation, Progression, and Metastasis: A Critical Systematic Review of In Vivo Preclinical Data. Vol. 76, *Cancer Research*. 2016. p. 4032–50.
 41. Moore SC, Lee I-M, Weiderpass E, Campbell PT, Sampson JN, Kitahara CM, et al. Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. *JAMA Intern Med.* 2016;175(6):959–67.
 42. Schwartz AL, de Heer HD, Bea JW. Initiating Exercise Interventions to Promote Wellness in Cancer Patients and Survivors. *Oncology (Williston Park)*. 2017;
 43. Va M, Connor OP, Soh C. reviews 46. 2014;23(Suppl 7).
 44. Campbell PT, Patel A V, Newton CC, Jacobs EJ, Gapstur SM. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Associations of Recreational Physical Activity and Leisure Time Spent Sitting With Colorectal Cancer Survival. 2019;31(7).
 45. Reid MA, Dai Z, Locasale JW. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nat Cell Biol [Internet]*. 2017;19(11):1298–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3629>
 46. Gao X, Reid MA, Kong M, Locasale JW. Metabolic interactions with cancer epigenetics. *Mol Aspects Med [Internet]*. 2017;54:50–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.09.001>
 47. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells 1. *J Cancer Res.* 1925;
 48. Teslaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol.* 2014;542:91–114.
 49. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:S129–50.
 50. Obre E, Rossignol R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: Metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol [Internet]*. 2015;59:167–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.12.008>
 51. El Bacha T, Luz M, Da Poian A. Dynamic Adaptation of Nutrient Utilization in Humans. *Nat Educ.* 2010;
 52. Danhier P, Ba P, Payen VL, Grasso D, Ippolito L, Sonveaux P, et al. *Biochimica et Biophysica Acta* Cancer metabolism in space and time : Beyond the Warburg effect ☆. 2017;1858:556–72.
 53. Shestov AA, Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Hung YP, Huang L, et al. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife.* 2014;
 54. Zhao D, Wang W, Wang H, Peng H, Liu X, Guo W, et al. PKD knockdown inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy by promoting autophagy via AKT/mTOR pathway. *Int J Biol Sci.* 2017;13(3):276–85.
 55. Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, et al. PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. *Cancer Cell [Internet]*. 2018;33(3):355–367.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.004>

56. Chen YJ, Mahieu NG, Huang X, Singh M, Crawford PA, Johnson SL, et al. Lactate metabolism is associated with mammalian mitochondria. *Nat Chem Biol*. 2016;12(11):937–43.
57. Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, et al. PDK1-dependent metabolic reprogramming dictates metastatic potential in breast cancer. *Cell Metab*. 2015;22(4):577–89.
58. Yang Y, Ishak Gabra MB, Hanse EA, Lowman XH, Tran TQ, Li H, et al. MiR-135 suppresses glycolysis and promotes pancreatic cancer cell adaptation to metabolic stress by targeting phosphofructokinase-1. *Nat Commun [Internet]*. 2019;10(1):809. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-08759-0>
59. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;
60. Leung E, Cairns RA, Chaudary N, Vellanki RN, Kalliomaki T, Moriyama EH, et al. Metabolic targeting of HIF-dependent glycolysis reduces lactate, increases oxygen consumption and enhances response to high-dose single-fraction radiotherapy in hypoxic solid tumors. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–12.
61. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*. 2013;
62. Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. Mitochondrial uncoupling and the warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Research*. 2009.
63. Otto AM. Warburg effect (s) — a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab [Internet]*. 2016;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40170-016-0145-9>
64. Courtney KD, Bezwada D, Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Funk AM, et al. Isotope Tracing of Human Clear Cell Renal Cell Carcinomas Demonstrates Suppressed Glucose Oxidation In Vivo. *Cell Metab*. 2018;
65. Herbert Grace Crabtree B. Clx. the Carbohydrate Metabolism of Certain Pathological Overgrowths. *Biochem J*. 1928;
66. Hensley CT, Faubert B, Yuan Q, Lev-Cohain N, Jin E, Kim J, et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell*. 2016;
67. Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi RM, Ferraris D V., Tsukamoto T, et al. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab*. 2012;
68. Maher EA, Marin-Valencia I, Bachoo RM, Mashimo T, Raisanen J, Hatanpaa KJ, et al. Metabolism of [U-13C]glucose in human brain tumors in vivo. *NMR Biomed*. 2012;
69. Schmitt S, Zischka H. Targeting Mitochondria for Cancer Therapy. *Dtsch Zeitschrift fur Onkol*. 2018;
70. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*. 2015.
71. Finkel T, Deng C-X, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature [Internet]*. 2009;460(7255):587–91. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08197>
72. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 Is a Mitochondria-Localized Tumor Suppressor Required for Maintenance of Mitochondrial Integrity and Metabolism during Stress. *Cancer Cell [Internet]*. 2010;17(1):41–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.023>

73. Mina T, Goodman E, Sciences L. The complex role of SIRT6 in carcinogenesis. 2016;37(2):108–18.
74. Yun J, Johnson JL, Hanigan CL, Locasale JW. Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. *Front Oncol*. 2012;2(November):1–10.
75. Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Bhimavarapu A, et al. The SIRT1 Deacetylase Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Colon Cancer Growth. 2008;3(4).
76. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. 2013;2072–85.
77. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* [Internet]. 2012;21(3):297–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
78. Ioris RM, Galié M, Ramadori G, Anderson JG, Charollais A, Konstantinidou G, et al. SIRT6 Suppresses Cancer Stem-like Capacity in Tumors with PI3K Activation Independently of Its Deacetylase Activity. *Cell Rep*. 2017;18(8):1858–68.
79. Brand A, Singer K, Koehl GE, Mueller-kliesser W, Renner K, Kreutz M, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Article LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. 2016;1–15.
80. Li Y, Zhang D, Wang X, Yao X, Ye C, Zhang S, et al. Hypoxia-inducible MIR-182 enhances HIF1 α signaling via targeting PHD2 and FIH1 in prostate cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(December 2014):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep12495>
81. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2010.
82. Hayashi Y, Yokota A, Harada H, Huang G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(5):1510–7.
83. de Heer EC, Jalving M, Harris AL. HIFs, angiogenesis, and metabolism: Elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5074–87.
84. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721–32.
85. Ebright RY, Zachariah MA, Micalizzi DS, Wittner BS, Niederhoffer KL, Nieman LT, et al. HIF1A signaling selectively supports proliferation of breast cancer in the brain. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 9;11(1):6311. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-20144-w>
86. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [Internet]. 1993 Dec [cited 2016 Jul 14];75(5):843–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749390529Y>
87. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. Vol. 6, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005. p. 376–85.
88. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
89. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018.
90. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Jul 19];11(3):228–34. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb0309-228>

91. Wang X-F, Li Q-J, Bigner DD, Yuan L, Wang Q, Feng Y, 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* [Internet]. 2016;29(1):49–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.005>
92. Cao K, Li J, Chen J, Qian L, Wang A, Chen X, et al. microRNA-33a-5p increases glycolysis in melanoma radiosensitivity by inhibiting. 2017;1–13.
93. Zhou Y, Huang Z, Wu S, Zang X, Liu M, Shi J. miR-33a is up-regulated in chemoresistant osteosarcoma and promotes osteosarcoma cell resistance to cisplatin by down-regulating TWIST. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2014;33(1):1–12. Available from: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*
94. Wang H, Sun T, Hu J, Zhang R, Rao Y, Wang S, et al. miR-33a promotes glioma-initiating cell self-renewal via PKA and NOTCH pathways. 2014;124(10):4489–502.
95. Yuan J, Yang F, Wang F, Ma J, Guo Y, Tao Q, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2014 May 12 [cited 2016 Jul 14];25(5):666–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24768205>
96. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting MicroRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges. *Nat Rev Clin* 2010;48(Suppl 2):1–6.
97. Baggish AL, Park J, Min P-K, Isaacs S, Parker BA, Thompson PD, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2014 Mar;116(5):522–31.
98. Mooren FC, Viereck J, Krüger K, Thum T. Circulating micrnas as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2014 Aug 25];306(4):H557--63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363306>
99. Fernandes T, Magalhaes FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: Role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*. 2012;59(2 SUPPL. 1):513–20.
100. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2016 May 3];34(8):760–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>
101. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1287–95.
102. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;
103. Zammit VA, Newsholme EA. The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminas. *Biochem J*. 1976;
104. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* [Internet]. 2010;102(11):1555–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642>
105. Sell SL, Widen SG, Prough DS, Hellmich HL. Principal component analysis of blood microRNA datasets facilitates diagnosis of diverse diseases. *PLoS One* [Internet].

- 2020;15(6 June):1–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0234185>
106. Qin LX, Zhou Q. MicroRNA array normalization: An evaluation using a randomized dataset as the benchmark. *PLoS One*. 2014;9(6).
 107. Zhong W, Myers JS, Wang F, Wang K, Lucas J, Rosfjord E, et al. Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. *BMC Genomics*. 2020;21(1):1–17.
 108. Finley LWSS, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1 α Destabilization. *Cancer Cell* [Internet]. 2011;19(3):416–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.02.014>
 109. Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, Galán M, Martínez-Revelles S, Avendaño MS, et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2014 Aug 25];168(3):686–703. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3579288&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
 110. Da Silva ND, Fernandes T, Soci UPR, Monteiro AWA, Phillips MI, De Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(8):1453–62.
 111. Bishop DJ, Botella J, Granata C. CrossTalk opposing view: Exercise training volume is more important than training intensity to promote increases in mitochondrial content. *J Physiol* [Internet]. 2019;0:JP277634. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/JP277634>
 112. Li J, He Y, Tan Z, Lu J, Li L, Song X, et al. Wild-type IDH2 promotes the Warburg effect and tumor growth through HIF1 α in lung cancer. *Theranostics*. 2018;8(15):4050–61.
 113. Teicher BA, Linehan WM, Helman LJ. Targeting cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5537–45.
 114. Maximov V V., Akkawi R, Khawaled S, Salah Z, Jaber L, Barhoum A, et al. MiR-16-1-3p and miR-16-2-3p possess strong tumor suppressive and antimetastatic properties in osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2019;145(11):3052–63.
 115. Han T, Wu N, Wang Y, Shen W, Zou J. MiR-16-2-3p inhibits cell proliferation and migration and induces apoptosis by targeting PDPK1 in maxillary primordium mesenchymal cells. *Int J Mol Med*. 2019;43(3):1441–51.