

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDO TADEU TREVISAN FRAJACOMO

Efeitos das modalidades de exercício aeróbio, resistido ou combinado na carcinogênese
química experimental do cólon de camundongos

Ribeirão Preto

2014

FERNANDO TADEU TREVISAN FRAJACOMO

Efeitos das modalidades de exercício aeróbio, resistido ou combinado na carcinogênese
química experimental do cólon de camundongos

Tese apresentada ao Departamento de Patologia e
Medicina Legal da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto

2014

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Frajacomo, Fernando Tadeu Trevisan

Efeitos das modalidades de exercício aeróbio, resistido ou combinado na carcinogênese química experimental do cólon de camundongos. Fernando Tadeu Trevisan Frajacomo, orientador: Sérgio Britto Garcia. Ribeirão Preto, 2014

94f.: il. 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Patologia.

1. Exercício Físico. 2. Câncer de cólon. 3. Biomarcadores do câncer. 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Frajacomo, Fernando Tadeu Trevisan

Título: Efeitos das modalidades de exercício aeróbio, resistido ou combinado na carcinogênese química experimental do cólon de camundongos.

Tese apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Área de Concentração: **Patologia Experimental**

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais por acreditarem de maneira incondicional em meu caráter, apoiar meus sonhos e me dar as bases morais para alcançá-los.

A todos que lutam, acreditam e pesquisam mecanismos no combate ao câncer

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar uma vida digna de lutas e conquistas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Sérgio Britto Garcia, por todos seus ensinamentos que muitas vezes foram além do ambiente acadêmico e acreditar que a paixão do aluno em conduzir sua pesquisa é uma condição fundamental para seu sucesso.

As técnicas de laboratório, Rose Lopes, Erica, Deise Lúcia por toda atenção, apoio e amizade.

Ao Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Professor Dr. Alceu e sua técnica Paula Payão pela atenção e apoio técnico e financeiro nas análises de estresse oxidativo e discussões sobre o trabalho.

Ao Laboratório da Professora Gabriela Silva Bisson e sua pós graduando Thaís Herrero pelo apoio técnico e financeiro nas análises das citocinas.

Ao laboratório do Professor Leonardo Silveira e sua pós graduanda Marina Barbosa pelo apoio técnico na dosagem da catalase e citrato sintase.

Aos meus amigos que de muito longe ou de perto sempre acreditaram em meu trabalho e me deram forças para continuar.

Aos pós graduandos e funcionários do departamento de Patologia e Medicina Legal e do CEMEL

To my colleagues from the SMERF Lab in the University of Utah, my mentor Dr. Paul LaStayo, Dr Robin Marcus, Dr. Micah Drummond and Sheldon Smith, thank you.

Agradeço à CAPES, importante agência financiadora desse estudo, agradeço por me proporcionar novas experiências profissionais e pessoais no exterior. sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento de minha formação acadêmica.

Agradeço à Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por todo investimento em minha formação ética e profissional. Espero conduzir com afinco o padrão de excelência daqui herdado.

RESUMO

FRAJACOMO, F.T.T. **Efeitos das modalidades de exercício aeróbio, resistido ou combinado na carcinogênese química experimental do cólon de camundongos**. 2014. 94f, Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos das modalidades de exercício aeróbio, resistido ou combinado sobre a formação de lesões pré-neoplásicas induzidas pelo carcinógeno N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) e analisar o balanço oxidativo e a modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias como possíveis mecanismos de controle sobre a carcinogênese de cólon. Foram utilizados camundongos machos BALB/c, divididos em oito grupos sendo, sedentário (S, n=6), aeróbio (A, n=8), resistido (R, n=8) e combinado (C, n=8). Os mesmos protocolos de exercício foram repetidos em grupos que receberam a aplicação do MNNG (M, 4 doses, 5mg/ml), sedentário + M (SM, n=6), aeróbio + M (AM, n=8), resistido + M (RM, n=8) e combinado + M (CM, n=8). Após oito semanas de exercício, os animais foram sacrificados e o cólon, fígado, músculo e soro foram coletados para análises. Os resultados demonstraram que todos os protocolos de exercício aumentaram a atividade de catalase enquanto que somente o grupo CM aumentou de maneira significativa a dosagem de citrato sintase (CS) no sóleo. O protocolo aeróbio teve menor a formação de focos de criptas aberrantes (FCAs) e multiplicidade, associado a menor imunomarcagem para Metalotioneína (MT), ao passo que o marcador de proliferação celular (PCNA) não alterou em respostas aos diferentes protocolos de exercício. Em paralelo, o modelo aeróbio favoreceu maiores níveis de IL-10 no tecido colônico. Entretanto, os grupos RM e CM não alteraram a formação de FCAs e os níveis de citocinas pró (IL-12, IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) no cólon. Além disso, o grupo RM obteve menor razão entre glutatona reduzida e glutatona oxidada (GSH/GSSG) no fígado, e o grupo combinado obteve maiores níveis de produtos avançados de peroxidação proteica (AOPP) no músculo e no fígado, enquanto que os níveis de AOPP no cólon não se alterou. Esses dados sugerem que os efeitos do exercício na carcinogênese de cólon são modalidade-dependente em favor do protocolo aeróbio e que aos maiores concentrações de IL-10 colônica por essa modalidade possa ser seu mecanismo de controle sobre desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas no cólon.

Palavras-chave: Exercício Físico. Câncer de cólon. Biomarcadores do câncer. Estresse Oxidativo. Citocinas

ABSTRACT

FRAJACOMO, F.T.T. **Effects of aerobic, resistance or combined exercise modality on chemically-induced colon carcinogenesis in mice.** 2014. 94f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The aim of this study was to investigate the effects of aerobic, resistance and combined (aerobic + resistance) over colonic preneoplastic formations induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and analyze the oxidative stress balance and colonic cytokines modulation as possible mechanisms of colon carcinogenesis control. We used male mice BALB/c allocated into eight groups, sedentary (S, n=6), aerobic (A, n=8), resistance (R, n=8) and combined (C, n=8), and the same exercise protocols were repeated in others four more groups carcinogen-induced MNNG (M), four doses, 5mg/ml, sedentary + M (SM, n=8), aerobic +M (AM, n=8), resistance + M (RM, n=8) and combined + M (CM, n=8). After eight training weeks, mice were sacrificed and colon, liver, muscle and serum were collected to analyses. Our data showed that all exercise protocols increased catalase activity whereas citrate synthase (CS) was only significant elevated in CM group in soleus muscle. The AM group reduced aberrant crypt foci (ACF) formation and multiplicity, and immunohistochemistry labeling for Metallothionein (MT) in mice colon whereas proliferation index by PCNA did not change in response to exercise protocols. In addition, AM group increased IL-10 content in colon tissue. However, the RM and CM did not reduce ACF formation and altered pro (IL-12, IFN- γ , and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) in the colon tissue. Furthermore, the RM group decreased reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione liver ratio (GSH/GSSG) and the CM group elevated advanced oxidation protein products (AOPP) in liver and muscle, whereas AOPP in colon did not change. These data suggest that the exercise effects on colon carcinogenesis are modality-dependent in favor to aerobic protocol and the upper regulation of IL-10 in colon tissue might be a mechanism modulation of aerobic exercise against colonic pre neoplastic formation.

Keywords: Exercise. Colon cancer. Cancer biomarkers. Oxidative stress. Cytokines.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da formação de espécies reativas de oxigênio via disfunção mitocondrial

Figura 2. Esquema representativo dos grupos experimentais.

Figura 3. Gráficos do acréscimo de carga dos grupos experimentais submetidos ao protocolo de exercício resistido.

Figuras 4. Área de secção transversa do músculo gastrocnêmio.

Figura 5. Análise dos produtos de peroxidação proteica (AOPP, figura 5A) e hidroperóxidos lipídicos (FOX, figura 5B) no músculo bíceps e tríceps braquial dos grupos experimentais.

Figura 6. Análise enzimática no músculo sóleo dos grupos experimentais. (figura 6A) Expressão proteica da catalase em relação ao controle β -actina e (figura 6B) atividade de citrato sintase (CS).

Figura 7. Marcadores do estresse oxidativo sérico.

Figura 8. Marcadores de estresse oxidativo hepático.

Figura 9. Análise dos produtos de peroxidação proteica (AOPP) no cólon dos grupos experimentais

Figura 10. Figura ilustrativa da mucosa colônica corado com H&E e a formação e multiplicidade dos FCAs.

Figura 11. Figuras ilustrativas da marcação positiva para PCNA e MT.

Figura 12. Concentração de citocinas no tecido colônico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cargas referentes às repetições do protocolo de exercício resistido. Carga “livre” significa uma subida sem peso adicional.

Tabela 2. Estado geral dos animais ao final do estudo

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

EROS- Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

MNNG- N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

FCAs – Focos de Cripta Aberrante

Ras – Rat Sarcoma Virus

APC - adenomatous polyposis coli

Wnt - int/Wingless

DSS- Dextran Sodio Sulfato

DMH- 1,2-dimetilhidrazina

AOM- Azoximetano

DNA - ácido desoxirribonucleico

MT- metalotioneína

PCNA- antígeno nuclear de proliferação celular

RLs- radicais livres

MDA - malondialdeído

AOPP- produtos avançados de oxidação proteica

SOD- superóxido dismutase

GSH- *gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine* -glutationa reduzida

GPx- glutationa peroxidase

GSSG – glutationa oxidada

GR- glutationa redutase

IL-1 β - interleucina do tipo 1 β

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa (

IL-8, IL-10, IL-12 – interleucinas do tipo 8, 10 e 12

TGF- β - fator de transformação de crescimento-beta (

IRM - uma repetição máxima

ACSM- American College of Sports Medicine

ACS - American Cancer Society

CYP- citocromo P450

GST- glutationa S-transferase

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

COX-2 - ciclooxigenase 2

iNOS- óxido nítrico sintetase induzida

IL-1ra - receptor antagonista da IL-1

CETEA- Comissão de Ética em Experimentação Animal

FMRP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

H&E - Hematoxilina-eosina

DAB - Diamino Benzydina

TBARS- Espécies Reativas de ácido Tiobarbitúrico

PBS- tampão fosfato

HCl- ácido clorídrico

TCA- ácido tricloroacético

TBA- ácido 2-tiobarbitúrico

BHT- hidroxitoluenobutilato

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

KI- potássio iodado

TNB - 5' thio-2-acido nitrobenzóico

DTNB - 5,5'-ditiois 2-ácido nitrobenzóico

SDS - dodecil sulfato de sódio

TBST - 10mM tris HCl, 100mM NaCl, 0,02% Tween 20

HRP- horseradish peroxidase

CAT - capacidade antioxidante total

ABTS - 2,2"-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

CK - creatina kinase

CS - citrato sintase

CoA - coenzima A

DTNB - ácido 5,5'ditio-bis 2 nitrobenzoico

BSA - albumina bovina

Th1 – Linfócito T *Helper* 1

Th2- Linfócito T *Helper* 2

GST – Glutaciona S-transferase

NQO-1 - NADPH-quinona-oxidoreductase -1

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO	16
1.1 Contextualização	16
1.2 Câncer de cólon.....	17
1.3 Relevância do modelo experimental de carcinogênese de cólon e marcadores histomorfológicos.....	17
1.4 Mecanismos biológicos relacionados ao desenvolvimento da carcinogênese de cólon.....	21
1.4.1 Papel do estresse oxidativo associado à carcinogênese.....	21
1.4.2 Influência da inflamação e do sistema imune na carcinogênese de cólon	23
1.5 Interação entre câncer e exercício físico	25
1.5.1 Influência do exercício físico na modulação dos mecanismo biológicos relacionados à carcinogênese	26
1.5.1.1 Modulação via exercício aeróbio	26
1.5.1.2 Modulação via exercício resistido.....	27
1.5.1.3 Modulação via treinamento combinado (aeróbio e resistido)	29
2.0 JUSTIFICATIVA	30
3.0 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos Primários.....	30
3.2 Objetivos Secundários.....	30
4.0 MATERIAS E MÉTODOS	31
4.1 Animais e procedimentos	31
4.2 Delineamento experimental e aplicação do carcinógeno	31
4.3 Protocolos de Exercício Físico	33
4.3.1 Protocolo de exercício aeróbio	33
4.3.2 Protocolo de exercício resistido	33
4.3.3 Protocolo de exercício combinado.....	35
4.4 Curva de desempenho e aumento de carga	35
4.5 Coleta do material	36

4.6	Processamento histológico	36
4.6.1	Determinação da morfologia muscular do gastrocnêmio.....	37
4.6.2	Determinação dos FCAs no cólon.....	37
4.7	Imunoistoquímica.....	38
4.7	Análises Bioquímicas	39
4.7.1	Determinação do MDA	39
4.7.2	Determinação do produtos reativos do ácido tio-brabitérico (TBARS).....	39
4.7.3	Determinação de hidroperóxidos lipídicos.....	40
4.7.4	Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)	40
4.7.5	Determinação os indicadores antioxidantes	41
4.7.5.1	Determinação da Glutathione total (GSH + 2GSSG).....	41
4.7.5.2	Glutathione Reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).....	41
4.7.5.3	Determinação da atividade da Catalase.....	42
4.7.5.4	Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT) baseado no ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox).....	43
4.8	Dosagens enzimáticas.....	43
4.8.1	Creatina kinase	43
4.8.2	Citrato sintase	43
4.9	Dosagem de citocinas.....	44
4.10	Análises estatísticas.....	44
5.0	RESULTADOS	45
5.1.	Estado geral dos animais e taxa de mortalidade.....	45
5.2	Aumento de cargas e análise da hipertrofia muscular.....	45
5.3	Marcadores de estresse oxidativo e atividade enzimática do músculo esquelético	47
5.4.	Marcadores de estresse oxidativo sérico	48
5.5	Marcadores do estresse oxidativo hepático.....	49
5.6	Marcadores do estresse oxidativo do cólon.....	51
5.7	Análise dos marcadores histopatológicos do cólon.....	51

5.7.1 Análise das citocinas no tecido colônico.....	54
6.0 DISCUSSÃO.....	55
7.0 CONCLUSÃO.....	63
8.0 REFERÊNCIAS.....	64
9.0 ANEXOS.....	81
9.1 Aprovação do comitê de ética.....	81
9.2 Tabelas de treinamento.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

Inflamação e estresse oxidativo são eventos iniciadores e promotores da transformação neoplásica desde seu estágio inicial, até fases mais avançadas da tumorigênese de cólon. Esses eventos interagem no desenvolvimento neoplásico quando espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) quando não devidamente neutralizadas pelos antioxidantes tem a ação genotóxica por danificar diretamente o DNA ou indiretamente por interagir com proteínas, carboidratos e lipídios causando significativa perturbação do meio intracelular. Alterações na homeostasia celular e danos a sua estrutura favorecem o recrutamento de células inflamatórias ao sítio de lesão que exercem sua função mediante a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias que, por sua vez, potencializam a ação dos radicais livres em um ciclo vicioso. Carcinógenos químicos de ação direta como o N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) mimetizam esse processo de ação genotóxica e severa reação inflamatória no tecido acometido. No cólon, este carcinógeno apresentou lesões pré-neoplásicas importantes e condizentes processo de carcinogênese colônica podendo ser útil na investigação de mecanismos de controle das lesões pré-neoplásicas.

O controle do processo da carcinogênese colônica, via exercício físico, tem sido apontado por modelos experimentais e estudos epidemiológicos, como uma estratégia plausível na modulação de eventos biológicos associados a esse processo. Um significativo conjunto de evidências relataram efeitos positivos da modalidade aeróbia na carcinogênese de cólon, dentre eles, o combate ao estresse oxidativo e controle da inflamação são apontados como causas mais prováveis de modulação dos marcadores de lesões pré-neoplásicas como os Focos de Cripta Aberrante (FCAs). Sabe-se, entretanto, que essa modulação apresentou uma curva dose-resposta. Recentemente, foi reconhecido que um programa otimizado de exercícios visando prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas, como o câncer, deva conter exercícios aeróbios e resistidos em um programa estruturado. No entanto, no processo de carcinogênese colônica, por exemplo, os efeitos do exercício resistido isolado ou combinado à modalidade aeróbia permanecem desconhecidos. Sabe-se que o exercício resistido potencializa a ação do músculo esquelético como órgão endócrino modulando a produção/liberação de citocinas e alterando o balanço oxidativo. Dessa forma, sabendo que cada modalidade, aeróbia, resistida ou combinada, apresenta uma

característica metabólica e adaptativa distinta, faz-se necessário uma investigação dessas modalidades de exercício sobre as etapas iniciais da carcinogênese de cólon.

1.2 Câncer de cólon

Estudos epidemiológicos apontam que o câncer de cólon e reto representam a terceira causa de incidência de câncer no mundo, afetam homens e mulheres quase que igualmente e representam cerca de 10% de todos os tumores mundiais diagnosticados anualmente (Hagggar & Boushey 2009). Apesar dos progressos científicos sobre a prevenção e o diagnóstico precoce das neoplasias terem sido expressivos na última década, o câncer de cólon e reto permanecem como a quarta causa em mortalidade por câncer (Jemal et al. 2008)

A distribuição geográfica do câncer de cólon sugere uma maior prevalência desse tipo de tumor nos países desenvolvidos, com cerca de 63% de todos os casos (Boyle & Langman 2000). A patogênese do câncer de cólon apresenta uma importante correlação com os fatores ambientais como a obesidade, níveis de atividade física, dieta e consumo de álcool, sendo considerada por alguns autores como uma “doença ambiental” (Hagggar & Boushey 2009). Dentre os fatores protetores de câncer de cólon, a dieta e o exercício físico regular correspondem como principais fatores modificáveis, embora essas evidências sejam mais expressivas para o câncer de cólon isolado comparado ao de reto (Bazensky et al. 2007).

Nessa linha, cerca de 50 estudos examinaram a associação entre maiores níveis de atividade física e redução da incidência de câncer de cólon e reto (Slattery 2004), e apontaram para uma redução de 30 a 40% dos riscos de desenvolver esses tumores, sendo que tal redução se mostrou independente dos valores de índice de massa corporal (Kushi et al. 2006). A magnitude desses benefícios indica uma curva dose-resposta do exercício nesta neoplasia especialmente em modelos animais (Na & Oliynyk 2011), sendo que intensidades ótimas de exercício ainda permaneça sobre intenso debate (Trojian et al. 2007).

1.3 Relevância do modelo experimental de carcinogênese de cólon e marcadores histomorfológicos

O modelo de carcinogênese em roedores tem sido amplamente investigado para o melhor entendimento das etapas de transformação neoplásica (Ames & Gold 1992). Seu grau de similaridade genético e biológico compartilham em muitos aspectos às etapas do desenvolvimento

neoplásico em humanos, ao qual elegem esse modelo como uma estratégia plausível para o estudo de novas terapias nas etapas pré-clínicas do diagnóstico (Balmain & Harris 2000). Em ambas as espécies, mutações pontuais levam a alterações da família do gene RAt Sarcoma vírus (*ras*). A proteína *ras* é normalmente ativa por sinais externos como fatores de crescimento, citocinas e hormônios na superfície celular (Campbell et al. 1998). No câncer de cólon, essa proteína se encontra ativada e mutações no oncogene *K-ras* dessa família contribuem para a transição de adenomas intermediários para adenocarcinomas (Kressner et al. 1998). Além disso, mutações no gene APC (*adenomatous polyposis coli*) e da β -catenina são reproduzidos em modelos animais de câncer de cólon. O gene APC é um importante supressor tumoral e está mutado em 85% dos casos de câncer coloretal esporádico. Além disso é um componente essencial da fosforilação aberrante da via da Wnt/ β -catenina que desempenham significativo papel na gênese desse câncer (Yang et al. 2006).

Historicamente, a maioria dos estudos abordando a carcinogênese de cólon tem sido conduzida em ratos (Madara et al. 1983). Contudo, a elevada incidência de tumores gerados no cólon distal de camundongos, bem como sua histogênese de adenomas múltiplos com subsequente desenvolvimento de adenocarcinomas, tem favorecido a importância dessa espécie no estudo na patogênese de câncer de cólon (Nambiar et al. 2003; Rosenberg et al. 2009). Dentre as espécies de camundongos sem alteração transgênica estudadas na carcinogênese colônica, a espécie BALB/c apresentou uma susceptibilidade moderada a formação de tumores colônicos induzidos por carcinógenos químicos (Izumi et al. 1979; Turusov et al. 1982) e essa espécie foi mais sensível que a espécie C57BL/6 em modelos combinados de indução química e reação inflamatória pela aplicação do Dextran Sódio Sulfato (DSS) gerando duas vezes mais tumores e maior multiplicidade que a espécie anterior (Suzuki et al. 2006).

A indução química de neoplasia é um processo que envolve dano ao DNA e estímulos à sobrevivência tumoral como aumento proliferativo e/ou evasão da apoptose (Klaunig et al. 2010). Este processo é subdividido em três estágios: iniciação: em que ocorre mutação não letal do DNA celular pela ação de um carcinógeno seguido de pelo menos uma replicação do DNA desta célula iniciada; promoção: caracterizado pela expansão clonal dessas células iniciadas pelo estímulo proliferativo e/ou inibição da apoptose resultando na formação de uma lesão focal, e progressão: estágio final que envolve mudanças celulares e moleculares irreversíveis como instabilidade

genética e alteração na integridade cromossômica, levando à transição de um fenótipo benigno para um maligno (Pitot et al. 1981; Klaunig & Kamendulis 2004).

Os carcinógenos químicos adquiriram ampla aceitação em pesquisas por serem capazes de mimetizar em grande espectro as alterações genéticas ocorridas na transformação neoplásica em humanos (Fearon & Vogelstein 1990). Os modelos mais populares de indução de carcinogênese química de cólon envolvem o uso de carcinógenos como fonte primária o grupo das hidrazinas como o 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o Azoximetano (AOM) (Rosenberg et al. 2009) O tratamento repetitivo com essas substâncias resultou na capacidade dos mesmos em atuar como agentes metilante do DNA para produzir tumores colônicos em roedores e exibir muitas das alterações patológicas associadas ao desenvolvimento da doença em humanos (Martin et al. 1973; Ward 1974). Contudo, uma outra classe de carcinógenos químicos de ação direta vem sendo testada com relativo sucesso na indução de tumores coloretais em roedores. Um representante dessa classe é o MNNG que apresenta alta afinidade de metilação na posição O⁶-metil-deoxiguanosina do DNA, localização responsável pelo reparo e estabilização do mesmo, o que representa uma evidência epidemiológica mais próxima aos tumores em humanos (Bardelli et al. 2001; Maurin et al. 2007). Além disso, o MNNG foi associado à maior produção de EROs e à liberação de cálcio no meio intracelular, ambos eventos relacionados ao maior dano celular, resposta inflamatória e instabilidade genética pelo carcinógeno (Chiu et al. 2011). As vantagens dessa classe são que não requerem ativação metabólica pelo grupo da citocromo P450 (CYP) ou pelas peroxidases, e são considerados potentes carcinógenos tópicos (Reddy et al. 1975). No entanto, a maior desvantagem desse modelo é que requer maior acurácia na aplicação intrarectal, e a quantificação do carcinógeno instilado torna-se difícil (Rosenberg et al. 2009)

Em ratos tratados com instilação intrarectal de MNNG não houve a formação de tumores em outros órgãos atrelado à sua capacidade alquilante direta, em contraste ao observado pelo tratamento de DMH ou de AOM que necessitam ser metabolizados (Swenberg et al. 1979; Jackson et al. 2003). Sobretudo, a instilação intrarectal de MNNG na dose de 1 a 3mg por rato por semana durante 20 semanas induziu a formação de tumores em 100% dos ratos da espécie F344, dos quais 43% foram adenocarcinomas e 57% adenomas (Rosenberg et al. 2009).

Estudos sobre as alterações morfológicas do epitélio colônico tratado com MNNG demonstraram que este carcinógeno pode induzir a formação de Focos de Criptas Aberrantes

(FCAs) (Bara et al. 2003; Maurin et al. 2007; Kannen et al. 2012), considerado desde os estudos pioneiros de Bird (1987), uma alteração pré-cancerígena de importante valor diagnóstico ao desenvolvimento de tumores de cólon. Em seus trabalhos subsequentes, Bird determinou uma grande variação histológica dos FCAs variando desde uma atipia moderada a uma severa displasia (Bird 1995; Bird & Good 2000). Os FCAs podem ser classificados em hiperplásicos e displásicos e estes ainda em graus moderados e severos (Gupta et al. 2007) No primeiro caso, encontra-se criptas maiores ou alargadas em relação às criptas normais, mucosa levemente elevada, leve depleção de células caliciformes sem displasia e células colunares preservadas, e os núcleos estão alongados sem estratificação (Paulsen et al. 2006; Gupta et al. 2007; Norlida & Phang 2010) No caso dos focos displásicos, ocorre a depleção mais acentuada de células caliciformes com reduzida produção de mucina, células justapostas envolvendo perda da diferenciação celular os núcleos do epitélio de revestimento glandular apresentam-se hiper cromáticos com manutenção da orientação visual (displasia leve-moderada) ou tendência à estratificação e nucléolo proeminente com várias mitoses (displasia moderada-severa) (Paulsen et al. 2006; Norlida & Phang 2010). Diversos estudos demonstraram que os FCAs hiperplásico possui um padrão de alteração genético e epigenético distinto dos FCAs displásicos, e outros trabalhos sugeriram que o FCA hiperplásico não estava diretamente relacionado à evolução tumoral (Paulsen et al. 2005; Norlida & Phang 2010). Contudo, outras evidências sugerem que os FCAs hiperplásicos podem progredir para focos displásicos (Mori et al. 2005). Dessa forma, padrões histológicos e morfológicos dos FCAs, especialmente os FCAs displásicos, tem sido usados como marcadores para avaliar a progressão ou a inibição de produtos naturais, drogas ou terapias não farmacológicas durante a carcinogênese de cólon (Corpet & Tache 2002).

Outro marcador de destaque nas lesões pré-neoplásica colônicas é a metalotioneína (MT) (Bruewer et al. 2002). A MT representa uma proteína de baixo peso molecular rica em grupos cisteínas que atuam como desintoxicante de metais como o Cobre (Cu) o Zinco (Z) durante o ciclo celular (Nagel & Vallee 1995). Em tecidos normais, a MT é pouco detectável por imunohistoquímica, exceto em certos tipos de células renais, tecido mioepitelial e tireoide (Bruewer et al. 2002). No cólon, a MT se concentra predominantemente sobre a camada de células tronco criptais seguidas de um padrão de colonização de toda extensão da cripta especificamente quando mutada (Jasani et al. 1998) sendo que a expressão aberrante de MT está relacionada com a mutação do gene supressor tumoral *p53*, mutação da atividade glicose 6-fosfato criptal e maior

taxa proliferativa e de expansão clonal no cólon (Nagel & Vallee 1995; Jasani et al. 1998) e em outros sítios tumorais (Zelger et al. 1993; Haerslev et al. 1994). Logo, a imunomarcacão exacerbada de MT nas criptas pode ser considerado um biomarcador de mutação de células tronco associados a expansão clonal e maior malignidade criptal (Donnelly et al. 2004; Mori et al. 2012) além de apresentarem positiva correlação com a formação de FCAs em camundongos tratados com carcinógeno químico (Donnelly et al. 2005).

As alterações histopatológicas do cólon como a formação de FCAs é frequentemente acompanhada do aumento de marcadores de proliferação celular como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Garcia et al. 2006; Hamiza et al. 2014). O PCNA é utilizado como marcador de replicação de DNA e proliferação celular e se mostrou aumentado em criptas displásicas mantendo sua expressão aberrante ao longo de toda transformação maligna (Shpitz et al. 1997)

1.4 Mecanismos biológicos relacionados ao desenvolvimento da carcinogênese de cólon

Após destacar o potencial genotóxico dos carcinógenos químicos e de que forma eles podem alterar o DNA culminando com a formação de lesões condizentes com o processo neoplásico colônico, faz-se necessário abordar o papel do estroma como parte integrante da biologia do desenvolvimento da carcinogênese de cólon e como a modulação da inflamação e do estresse oxidativo são eventos cruciais para este processo.

1.4.1 Papel do estresse oxidativo associado à carcinogênese

A geração de radicais livres (RLs) é um processo natural das reações no meio intracelular e sua função está ligada a diversas interações bioquímicas entre organelas, à ativação de fatores de transcrição e interação com o DNA, silenciando-o ou contribuindo para ativação de seus genes (Djordjevic 2004). Na carcinogênese, no desenvolvimento de doenças crônicas e/ou doenças ligadas ao envelhecimento, é comumente observado um desbalanço entre a produção de RLs, especialmente as EROs e ERNs, e suas defesas antioxidantes em favor dos primeiros (Khansari et al. 2009; El Assar et al. 2013; Ivanova & Yankova 2013), processo que foi originalmente denominado de estresse oxidativo por Sies & Cadenas (1985). Contudo, a complexidade desses eventos vão além do meio molecular, o que levou ao refinamento da definição de estresse oxidativo para uma desregulação da sinalização e do controle oxidante (Jones 2006). Dessa forma, pode ser considerado que a geração de altos níveis de RLs são lesivos aos componentes celulares,

contudo, baixos a moderados níveis de oxidantes desempenham um papel central na fisiologia celular atuando sobre a expressão gênica e a regulação das vias do ciclo celular (Reid 2001; Droge 2002).

Em adição ao seu potencial mutagênico, os RLs desencadeiam dano à membrana celular resultando em produtos da peroxidação lipídica. O malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos dessa peroxidação que possui ação mutagênica devido às suas propriedades eletrofilicas e nucleofílicas, formando produtos MDA-DNA (Ji et al. 1998; Riggins & Marnett 2001). Além disso, a peroxidação lipídica pode alterar a permeabilidade de membranas, reduzir a capacidade da célula em manter seu gradiente de concentração, alterar a função mitocondrial e favorecer a inflamação (Radak et al. 1999).

Outro produto da ação dos RLs é a oxidação de proteínas, em que há perda ou fragmentação de seus aminoácidos. O ataque dos RL às proteínas leva a formação de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) que esteve associado a gênese de doenças vasculares por mediar a regulação excessiva de células inflamatórias como neutrófilos, monócitos, linfócitos-T e células dendríticas (Alderman et al. 2002; Skvarilova et al. 2005). No câncer de cólon, elevados níveis plasmático AOPP estiveram estatisticamente correlacionados com a diminuição da capacidade antioxidante e o aumento do estresse oxidativo (Avinash et al. 2009). Em adição, um acúmulo de AOPP no epitélio colônico de pacientes com doença inflamatória intestinal esteve correlacionado com infiltrado celular inflamatório, morte celular e lesão intestinal nesses pacientes (Xie et al. 2014). Nesse sentido, recentes trabalhos sugerem que o AOPP não é somente um marcador de estresse oxidativo, mas também um mediador inflamatório no tecido trazendo valiosas informações sobre a relação entre estresse oxidativo e processo inflamatório (Skvarilova et al. 2005; Xie et al. 2014).

Dado o potencial de sinalização RLs e dos produtos de peroxidação com o DNA e de sinalização celular, é de suma importância que o organismo desenvolva um mecanismo antioxidante para reduzir o risco de dano celular nos períodos de aumento dos RLs. As principais defesas antioxidantes endógenas são realizadas através de reações enzimáticas, e incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (Mates et al. 1999). A glutathione é o componente de baixo peso molecular mais abundante no meio intracelular, é encontrada em grandes concentrações em células hepáticas sendo crucial para a proteção contra

aumentos excessivos das EROs (Lu 1999). Além disso, alterações em seu estado oxidativo estão envolvidas em diversas doenças crônicas, agudas ou no envelhecimento (Lang et al. 2000). A glutathiona encontra-se predominantemente em seu estado reduzido e é convertida pela ação da glutathiona peroxidase (GPx) em sua forma oxidada (GSSG), reduzindo RLs como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroperóxidos orgânicos em subprodutos como água ou álcool (Holmgren et al. 2005). Em condições fisiológicas, a GSSG é rapidamente convertida em sua forma reduzida pela ação da glutathiona redutase (GR), e essa conversão é necessária para garantir o equilíbrio entre GSH/GSSG, sendo que uma diminuição nessa razão é frequentemente associada a condições de estresse oxidativo (Schafer & Buettner 2001), como exemplificado na figura 1.

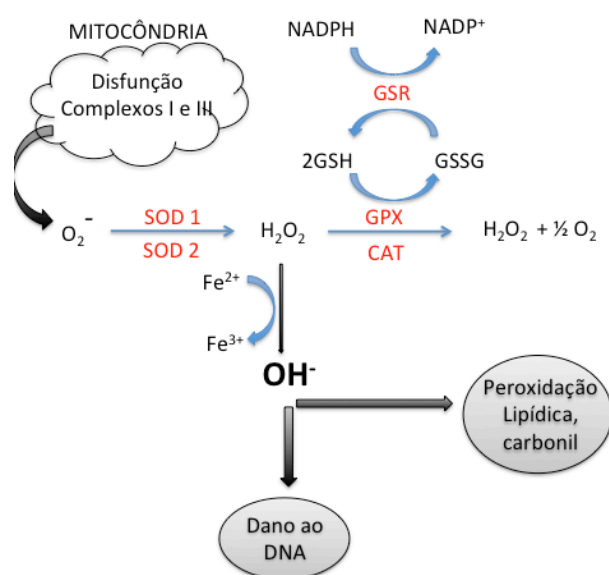


Figura 2. Representação esquemática da formação de espécies reativas de oxigênio via disfunção mitocondrial. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GSH-glutathiona reduzida, GSSG- glutathiona oxidada, GPx- glutathiona peroxidase, GSR-glutathiona S-redutase, Fe- íons ferro, $NADP^+$ e $NADPH$ - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada e reduzida, respectivamente. Adaptada de (Garrel et al. 2010) e (Finaud et al. 2006)

1.4.2 Influência da inflamação e do sistema imune na carcinogênese de cólon

Uma vez ocorrido a alteração de bases do DNA pelo carcinógeno químico, e sua alteração passar pelos pontos de controle do ciclo celular, esta célula alterada adquire vantagens proliferativas. Nesta etapa, um ponto crítico para a transformação neoplásica envolve a participação de substâncias promotoras da carcinogênese. A duração e a extensão da resposta inflamatória pode estar envolvido diretamente com o processo de transformação neoplásica (Eaden et al. 2001; Monteleone et al. 2012). O efeito regulatório das células inflamatórias sobre o

crescimento e a sobrevivência de células cancerígenas não em parte dependente da síntese de citocinas que podem, direta ou indiretamente, regular a atividade dessas células (Monteleone et al. 2012). Neste sentido, alguns autores utilizando terapias farmacológicas observaram uma correlação entre a redução de lesões pré-neoplásicas e a inibição da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina do tipo 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na mucosa colônica (Bousserouel et al. 2011).

O sistema imune da mucosa do tecido colônico é constantemente estimulado por bactérias intrínsecas ao intestino que ajudam no processo de digestão. Seu papel neste órgão é exercer uma ação central na modulação de uma resposta inflamatória para proteger a mucosa contra agentes agressores sem danificar a mucosa intestinal (Sipos et al. 2012). Uma vez alterado esse equilíbrio, um aumento do potencial destrutivo imunológico e inflamatório se estabelece, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e o câncer de cólon (MacDermott 1996).

De maneira específica, em resposta a uma inflamação crônica de baixo grau, bactérias presentes no lúmen intestinal expressam em sua parede moléculas de sinalização, como peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, e outros agentes quimiotáticos que induzem uma subsequente resposta imunológica e inflamatória da mucosa intestinal (MacDermott 1996). Este potente estímulo desencadeado pelas bactérias da mucosa intestinal são capazes de ativar macrófagos e linfócitos-T a liberarem diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas do tipo 1 e 6 (IL-1 e IL-6), e o TNF- α . O acúmulo de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α , sinaliza células epiteliais, endoteliais, macrófagos e fibroblastos do tecido a secretarem outras citocinas com potencial quimiotático, como a interleucina do tipo 8 (IL-8), que servem para potencializar a atração de macrófagos e granulócitos para mucosa inflamada (Izutani et al. 1995). Em contrapartida, o tecido responde ao aumento dessas citocinas pró-inflamatórias secretando outras citocinas de efeito anti-inflamatório, como a interleucina do tipo 10 (IL-10) e o fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β) (Jarry et al. 2008). Dentre as citocinas supressoras da patogênese colônica, a IL-10 apresenta grande destaque no processo de homeostase intestinal. Estudos clínicos e experimentais fortaleceram a relação inversa entre o aumento da expressão de IL-10 e a agressividade tumoral (Danese & Mantovani 2010), como exemplificado em estudo utilizando animais *knock-out* para IL-10 que se mostraram incapazes de

ativar suas defesas linfocitárias contra o processo de carcinogênese, fortalecendo o papel crucial dessa interleucina na mediação da resposta anti-inflamatória neste tecido (Sturlan et al. 2001).

A inflamação, aguda e crônica, é um processo claramente associado à carcinogênese. Esta teoria pôde ser comprovada em diversos estudos que combinaram a aplicação do carcinógeno químico a outro agente inflamatório, como o DSS, que acelerou e agravou o desenvolvimento de tumores em roedores (Onose et al. 2003; Tanaka et al. 2003; Neufert et al. 2007). No caso da aplicação intraluminal isolada de MNNG, foi observado um severo dano à superfície epitelial devido, em parte, às suas propriedades alquilantes seguido de uma reação inflamatória e alterações no processo de reparo (Che et al. 2010). A presença de infiltrado inflamatório com células do sistema imune que circundavam as lesões iniciais induzidas por MNNG sugerem uma forte correlação da inflamação na gênese das lesões pré-neoplásicas induzidas por este carcinógeno.

1.5 Interação entre câncer e exercício físico

Um crescente conteúdo de pesquisa tem apontado que o exercício regular de intensidade moderada-intensa tenha um potencial de reduzir a incidência de 10%-30% para diferentes tipos de câncer (Martinez 2005; Newton & Galvao 2008; Friedenreich et al. 2010; Bigley et al. 2013; Volaklis et al. 2013). Nesse sentido, faz-se necessário uma padronização da terminologia de exercício.

De acordo com Caspersen et al. (1985) e Howley (2001) exercício (ou treinamento físico) é uma subcategoria de atividade física planejada, estruturada com movimentos corporais repetitivos realizados para melhorar ou manter um ou mais componentes de seu desempenho físico. O exercício aeróbio (treinamento aeróbio) envolve a utilização de vários grupos musculares em atividades dinâmicas que resultam no aumento do gasto energético, e a participação regular nesta atividade leva a melhoras na função cardiovascular e no sistema músculo esquelético, resultando em aumento do desempenho de *endurance* cardiovascular (Howley 2001). O exercício resistido é designado especificamente para aumentar a força, potência e *endurance* muscular por variações na sua intensidade (porcentagem do valor obtido em uma repetição máxima – 1RM), número de repetições em cada sessão de exercício (séries), número de séries realizadas, e o intervalo de repouso entre cada série (Howley 2001). Ao passo que modelo de exercício que combina os conceitos do exercício resistido com o modelo aeróbio é chamado de exercício concorrente/combinado (Coffey et al. 2009).

Ainda que os estudos epidemiológicos relatem como “convincentes” a possível ligação dos efeitos preventivos do exercício regular sobre a incidência de câncer de cólon (Friedenreich et al. 2010), as características inerentes ao programa de exercício como intensidade, duração, frequência e a modalidade, dificultam a padronização dos estudos que raramente replicam os mesmos protocolos. Nesse sentido, algumas agências internacionais como o *American College of Sports Medicine (ACSM)* publicou seu mais recente guia de atividade para manutenção de saúde em 2011 (Garber et al. 2011) seguido pela *American Cancer Society (ACS)* que publicou um guia de atividade física seguindo as mesmas diretrizes da *ACSM* no ano seguinte (Kushi et al. 2012) voltado para a prevenção de diversas doenças crônicas, incluindo as neoplasias. Tais orientações são compostas por exercícios que integrem modalidades variadas semanalmente, como: exercício aeróbios, 150 minutos por semana em intensidade moderada ou 75 minutos em intensidade vigorosa; exercício resistido, 2 a 3 sessões semanais de intensidade moderada para os principais grupos musculares; e/ou combinação dessas modalidades em um programa semanal (Schmitz et al. 2010; Speck et al. 2010). No entanto, não há evidências dos efeitos das modalidades de exercício resistido ou combinados na etapas iniciais do desenvolvimento neoplásico.

1.5.1 Influência do exercício físico na modulação dos mecanismo biológicos relacionados à carcinogênese

1.5.1.1 Modulação via exercício aeróbio

Documentou-se que o exercício aeróbio pode atuar de maneira significativa sobre a modulação das fases de iniciação e promoção da carcinogênese (Rogers et al. 2008) Na fase de iniciação, alguns autores observaram que o mecanismo enzimático de reparo ao DNA, via 8-oxoG DNA glicosilase (hOGG1), foi supra regulado pelo treinamento em esteira por oito semanas (Radak et al. 2002). Além disso, o modelo aeróbio de natação se mostrou eficaz em suprimir a elevação de 8-OHdG em resposta ao carcinógeno renal Fe-nitrosotriacético (Nakatani et al. 2005). O exercício aeróbio pode inibir a ativação de carcinógenos ou aumentar seu processo de detoxicação por estimular a atividade da citocromo P450 (CYP) e da enzima glutatona S-transferase (GST) no fígado (Kim et al. 2002)

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais apontaram para um efeito positivo do exercício regular no controle dos marcadores do câncer colônico. Em recente revisão sobre o tema, Na & Oliynyk (2011) destacaram uma exclusividade da modalidade aeróbia na investigação da

carcinogênese de cólon quimicamente induzida. Além de diferenças no gênero dos roedores serem determinantes, os efeitos protetores na carcinogênese de cólon mostraram-se dependentes da intensidade do exercício empregado. Lunz e colaboradores observaram que a intensidade do exercício aeróbio foi um fator crucial na modulação dos FCAs em ratos (Lunz et al. 2008), pois uma sobrecarga de 2% do peso corporal reduziram os FCAs pelo protocolo de natação, ao passo que 0 ou 4% de sobrepeso não obtiveram reduções significativas sobre esse marcador em longo prazo (35 semanas). Resultados similares foram observados em um modelo de exercício intenso *versus* moderado em esteira, indicando um efeito dose-resposta da modalidade aeróbia (Silva et al. 2009). Nesse sentido, Demarzo e Garcia alertaram para o aumento dos FCAs em ratos submetidos à uma sessão única de exercício de natação exaustivo (Demarzo & Garcia 2004)

Ao passo que o efeito dose-resposta da modalidade aeróbia sobre a carcinogênese já esteja consolidado na literatura, poucos trabalhos exploraram os possíveis mecanismos de ação do modelo aeróbio. Dentre as evidências sobre o tema, a redução do processo inflamatório, modulação de citocinas e melhor balanço oxidativo indicados pela reduzida imunomarcação da ciclooxigenase 2 COX-2 (Demarzo et al. 2008), menor atividade da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e do TNF- α (Aoi et al. 2010), maior atividade apoptótica (Campbell et al. 2007) e controle sobre os fatores de crescimento como o Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (Ju et al. 2008) foram apontados como principais mecanismos de controle ao desenvolvimento neoplásico. Contudo, esse é um tema com grandes lacunas que continua sobre intensa investigação, fato que nos estimulou analisar os efeitos de novos modelos de exercício sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e investigar quais mecanismos (inflamação, controle oxidativo e resposta imune) poderiam justificar seus efeitos na carcinogênese de cólon.

1.5.1.2 Modulação via exercício resistido

O exercício resistido vem sendo considerado uma modalidade de exercício segura e eficaz na fase pós-diagnóstico de neoplasias, especialmente em condições de restrição hormonal e baixa capacidade aeróbia dos pacientes (De Backer et al. 2009; Brown et al. 2012; Speed-Andrews et al. 2013). Isso é devido, principalmente, pelo exercício resistido progressivo ser o modelo de mais eficaz no aumento de massa magra, resultado significativo para o paciente oncológico que apresenta perda de massa magra como uma importante manifestação clínica, que resulta em menor

responsividade ao tratamento e menor eliminação de toxicinas, levando ao pior prognóstico e aumento da morbidade e mortalidade (Attaix et al. 2005; Al-Majid & Waters 2008).

Em animais, vários modelos experimentais de exercício resistido foram implementados como a contração via estímulo elétrico (Klitgaard et al. 1990), cargas acopladas ao dorso de animais (Tamaki et al. 1992; Roy et al. 1997) e escalada com acréscimo de peso adicional (Hornberger & Farrar 2004), este último se destaca por mimetizar de forma mais específica os parâmetros de séries, intensidade, frequência e tempo de repouso dos modelos em humanos bem como permitir um padrão de recrutamento motor em resposta a carga mais próxima a fisiologia do animal (Lee & Farrar 2003). No estudo de Scheffer e colaboradores, o modelo de exercício resistido através do protocolo de escalada em ratos foi eficiente em aumentar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e Glutathione peroxidase (GPx) mantendo o equilíbrio oxidativo nas células musculares (Scheffer et al. 2012). Tais autores ainda indicaram que somente os grupos submetidos a baixas cargas e mais repetições (ênfase no volume de exercício) ou aquele submetido ao protocolo com altas cargas e baixas repetições (ênfase na força) obtiveram um menor estresse oxidativo em favor da redução dos produtos de peroxidação.

Modelos que investigaram os efeitos do exercício resistido após a inoculação de células tumorais observaram que o mesmo é uma estratégia eficiente na reversão do processo de caquexia sobre o músculo esquelético em animais (al-Majid & McCarthy 2001). Além disso, sabe-se que além da sarcopenia, o processo de caquexia é acompanhado de anorexia e inflamação crônica (Tisdale 2003). Nessa temática foi observado que o modelo de escalada em animais inoculados com- tumor de Walker-256 preveniu a caquexia do câncer via regulação sistêmica da inflamação crônica por regular a expressão de IL-10 e aumentar a razão IL-10/TNF- α , reconhecido indicador do estado inflamatório, em animais que realizaram o protocolo e receberam as células tumorais (Donatto et al. 2013).

Entretanto, as evidências do exercício resistido na fase preventiva do desenvolvimento neoplásico ainda são desconhecidas. Mesmo em fase pós-diagnóstico, as pesquisas empregando o exercício resistido e câncer são discretas comparadas ao modelo aeróbio. Em trabalho de revisão, Al-Majid & Waters (2008) reconhecem a importância clínica desta modalidade no câncer por atenuar a perda de massa magra no processo de caquexia e regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Neste sentido, a citocina IL-6 produzida pela contração muscular parece exercer um

efeito anti-inflamatório por controlar as citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-1 (Starkie et al. 2003). O efeito anti-inflamatório da IL-6 de origem muscular estimulou a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra), sendo que a IL-10 pode ainda inibir a produção de IL-1- α , IL- β e TNF- α (Pretolani 1999; Petersen & Pedersen 2006). Estas evidências sugerem que o exercício resistido possa exercer um papel modulatório sobre as citocinas exacerbando seu potencial anti-inflamatório o que o indica como uma estratégia de exercício plausível para a prevenção de doenças crônicas associadas ao processo inflamatório, como a carcinogênese de cólon.

1.5.1.3 Modulação via exercício combinado (aeróbico e resistido)

Desde o trabalho de pioneiro de Hickson (1980), popularizou-se que o treinamento aeróbico e resistido realizados em sequencia poderia gerar um comprometimento das adaptações à capacidade aeróbia ou a produção de força máxima quando comparada às modalidades isoladas. Isso foi descrito como “efeito concorrente”, contudo, atualmente, vários trabalhos parecem concordar que o exercício combinado, quando realizado de forma não simultânea e respeitado um período de repouso de pelo menos 6 horas, não prejudica as adaptações aos estímulos aeróbico e resistido, podendo até potencializar seus resultados (Lundberg et al. 2012; Lundberg et al. 2013) (McCarthy et al. 2002). Em idosos, o exercício combinado é recomendado como uma estratégia eficaz em manter a capacidade funcional e promover ganhos à saúde com pouca ou nenhuma interferência do efeito “concorrente” (Donnelly et al. 2009). Dessa forma, um crescente número de evidências tem apontado uma compatibilidade da modalidade combinada em diversas populações (Ferketich et al. 1998; Galvao et al. 2010; Karavirta et al. 2011) o que pode estimular o interesse dos centros de pesquisas em exercício para a prescrição dessa modalidade.

Apesar de crescente a literatura que investiga mecanismos de minimizar os efeitos “concorrentes” da modalidade combinada e potencializar os efeitos fisiológicos, poucos pesquisadores estudaram os efeitos dessa modalidade sobre as neoplasias. Em 2010, Galvão e colaboradores publicaram um estudo em que indivíduos com câncer de próstata em terapia de depressão andrógena praticavam um baixo volume de exercício aeróbico associado ao exercício resistido na mesma sessão, e seus resultados evidenciaram uma eficácia desse regime em reverter a toxicidade da terapia sobre o músculo esquelético pela diminuição da proteína C reativa além de ganhos na massa magra e melhorar seus indicadores funcionais como o teste de caminhada de 6

minutos quando comparados ao grupo sedentário (Galvao et al. 2010). Em sequência, o mesmo grupo de pesquisadores demonstraram que o exercício combinado resultou em aumento da capacidade física analisado a velocidade de caminhada e redução nos índices de fadiga em indivíduos com condição clínica similar ao estudo anterior (Buffart et al. 2014).

As evidências do regime de exercício combinando o modelo aeróbio e o resistido sobre o câncer de mama também foram positivas, com aumento da adesão ao tratamento e melhora nos índices de qualidade de vida em pacientes pós diagnóstico (Herrero et al. 2006; Milne et al. 2008).

Embora os estudos conduzidos com essa modalidade apontem para uma forma segura e eficaz de exercício nas etapas pós-diagnóstico, não há evidências de seus efeitos sobre nenhuma fase do desenvolvimento dos tumores colônicos.

2. JUSTIFICATIVA

As agências internacionais como o ACSM e o ACA já recomendam a prática de exercício resistido e aeróbio como estratégia mais eficaz na promoção de saúde. Foi observado que ambas modalidades podem exercer um efeito preventivo sobre doenças crônicas através da modulação dos processos inflamatórios, estresse oxidativo e resposta imune e sabendo que a patogênese da formação de lesões pré-neoplásicas está intimamente ligada a esses fatores, faz-se necessário uma investigação dos efeitos das modalidades aeróbia, resistida e combinada sobre a carcinogênese de cólon.

Nossa hipótese é que as diferentes modalidades de exercício possam reduzir a formação de lesões pré-neoplásicas de cólon induzidas pelo MNNG.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário:

Verificar o efeito das modalidades de exercício aeróbio, resistido e combinada (aeróbio + resistido) sobre a formação e multiplicidade dos FCAs no tecido colônico de camundongos inoculados com o carcinógeno químico MNNG.

3.2 Objetivos secundários:

Analisar os marcadores associados a proliferação celular, PCNA, e de mutação de células tronco, MT, no tecido colônico em respostas aos diferentes tratamentos e correlacionar com formação de FCAs;

Investigar o balanço do estresse oxidativo muscular, sérico e hepático e a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido colônico como potenciais agentes moduladores da carcinogênese de cólon;

Investigar as adaptações do músculo esquelético em resposta aos diferentes protocolos e exercício.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e procedimentos

Camundongos da espécie BALB/c, machos, foram provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia em condições de temperatura constante $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo noite-dia 12:12-h, e umidade relativa do ar de 60-70%. Foram alimentados com dieta padrão Purina[®] para ratos e camundongos, com a composição aproximada de (g/100g): proteína: 21,0; gordura: 3,5; carboidratos: 60,0; sais minerais: 5,3; complexo vitamínico: 2,0; e com valor energético de aproximadamente 3,5 kcal/g. Sendo a ração e a água ofertadas *ad libitum*. Os animais foram acomodados durante uma semana neste biotério para período de adaptação e mantidos em gaiolas com dimensão de 26x14x12 centímetros, com cinco animais por gaiola, seguindo as normas e regulamentação do Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório (<http://www.cobea.org.br>) e da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O projeto foi aprovado pelo referido órgão e protocolado sobre o número 013/2011, em anexo.

4.2 Delineamento experimental e aplicação do carcinógeno

Foram utilizados 62 camundongos da espécie BALB/c, machos, de aproximadamente 27g ao início do experimento. Os 62 animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos, sendo 4 grupos classificados como grupos controles: grupo sedentário (S, n=6); grupo exercício aeróbio (A, n=8); grupo exercício resistido (R, n=8) e grupo exercício combinado (C, n=8) e outros quatro grupos submetidos ao mesmo regime de exercício porém tratados com o carcinógeno químico N-

Metill-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (Sigma-aldrich, Steinheim, Alemanha). O MNNG apresenta fórmula molecular $C_2H_5N_5O_3$, e foi dissolvido em água destilada. A administração do mesmo foi feita 2 vezes por semana, no volume de 100µl concentração de 5mg/mL, durante as duas primeiras semanas, através de enema, segundo o protocolo de Kannen et al. (2012) e adaptado de Maurin et al. (2007) para o estudo do modelo químico de indução de carcinogênese de cólon. Tais grupos receberam a sigla M, em referência ao carcinógeno (MNNG), para indicar o tratamento com este carcinógeno, sendo grupo sedentário + MNNG (SM, n=8); grupo exercício aeróbio + MNNG (AM, n=8); grupo exercício resistido + MNNG (RM, n=8) e grupo exercício combinado + MNNG (CM, n=8). Os grupos controles S, A, R e C receberam quatro doses de 100µl de solução salina (soro fisiológico 0,9%) através de enema, como demonstrado na figura 2 abaixo.

Os animais foram pesados duas vezes por semana durante todo o experimento. As pesagem ocorreu em uma balança digital BP da marca FilizolaTM, capacidade de 15kg, sendo o peso dos animais registrados em gramas.



Figura 3. Esquema representativo dos grupos experimentais. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5, M (carcinógeno N-Metill-N'-nitro-N-nitrosoguanidina – MNNG), * aplicação das 4 doses do carcinógeno MNNG nas primeiras duas semanas, flecha representa o início dos protocolos de exercício físico que teve duração de 8 semanas.

4.3 Protocolos de Exercício Físico

4.3.1 Protocolo de exercício aeróbio

Como modelo de exercício aeróbio, os animais do grupo A e A + MNNG (AM) realizaram exercício de natação em reservatórios adaptados para esta prática. O modelo apresenta a vantagem do meio líquido ser considerado um ambiente natural dos roedores (Burneiko et al. 2006).

Inicialmente, os animais foram colocados no meio líquido como a água pré-aquecida em 32°C em profundidade suficiente para que os animais tivessem contato com a base do reservatório para aclimatização ao ambiente de exercício por 10 minutos. Esse procedimento ocorreu dois dias antes do início do protocolo. Durante a primeira semana de adaptação, o treinamento foi realizado por 20 minutos e, posteriormente, evoluiu com um aumento de 20 minutos a cada semana até alcançar, na terceira semana, 60 minutos, volume que foi mantido ao longo do período sem acréscimo de carga adicional. O exercício era realizado 5 dias por semana no período de 8 semanas, totalizando 40 sessões, de acordo com o protocolo adaptado de Venditti & Di Meo (1996).

4.3.2 Protocolo de exercício resistido

O protocolo isolado de exercício resistido foi executado pelos grupos R e RM, sendo utilizado uma escada como equipamento para a prática do exercício (80° de inclinação, 1 cm de espaço entre cada degrau e 0,5m de altura), no qual os animais eram adaptados a subir (escalar), figura 3, adaptado do modelo original (Hornberger & Farrar 2004). Os parâmetros utilizados para o treinamento correspondiam a uma única série com no mínimo seis e no máximo de oito escaladas (repetições), com dois minutos de intervalo entre cada repetição, sendo três sessões semanais intercaladas semanais durante oito semanas, totalizando 24 sessões. A escolha de três sessões semanais se baseou no protocolo original de Matheny e cols. (2009). Logo, na primeira semana, os animais foram acostumados ao equipamento de escalada sem nenhum peso adicional. Em seguida, as cargas de treinamento foram determinadas individualmente e divididos em duas etapas: 1) teste de carga máxima teste considerando o peso corporal e 2) sessões de treinamento considerando o peso máximo da sessão anterior, conforme demonstrado na tabela 1. Para o teste de carga máxima, um peso adicional composto por chumbada de pesca previamente graduada em gramas referente a 50% do peso corporal foi envolto de uma fita adesiva empacotadora marrom 369C, 50x50, da maraca 3M e acoplado à porção proximal da cauda do animal por uma tira elástica de látex (Fulgor[®]) seguidos das cargas referentes a 75, 90 e 100% do peso corporal nas

repetições seguintes. Se a última repetição com 100% do peso corporal fosse realizada com sucesso –atingisse o topo do equipamento- uma carga de 3g era adicionada até a falha da execução ou o animal atingisse a oitava repetição. Por fim, o valor de carga atingindo por cada animal neste teste foi considerada sua carga máxima. A partir da determinação do valor de carga máxima, as cargas das sessões de treinamento corresponderiam a: 1°- subida livre sem carga e da 2° subida em diante com 50% da carga máxima sessão anterior, seguidos por 75%, 90%, 100%, 100% + 3.0g (tabela 1), até a falha de execução, ou por atingir o máximo de oito repetições, segundo protocolo adaptado de (Matheny et al. 2009). Caso a falha ocorresse antes da sexta repetição, a carga era mantida por mais uma tentativa e depois reduzida para 75% da carga máxima até que atingisse um número mínimo de 6 repetições.

Tabela 3. Cargas referentes às repetições do protocolo de exercício resistido. Carga “livre” significa uma subida sem peso adicional.

	Semana 1, adaptação	Sessão única para determinação da Carga máxima	Sessões de treinamento (semanas 2-8)
Repetição	Carga (g)	Carga (g)	Carga (g)
1	Livre	Livre	Livre
2	Livre	50% peso corporal	50% peso da última sessão
3	Livre	75% peso corporal	75% peso da última sessão
4	Livre	90% peso corporal	90% peso da última sessão
5	Livre	95% peso corporal	95% peso da última sessão
6	Livre	100% peso corporal	100 % peso da última sessão
7	Livre	100% peso corporal + 3	100 % peso da última sessão + 3
8	Livre	100% peso corporal + 6	100 % peso da última sessão + 6

Note. As cargas em vermelho, repetições 7 e 8 da sessão de carga máxima e das sessões de treinamento só eram realizadas se o animal atingisse com sucesso as seis primeiras repetições.

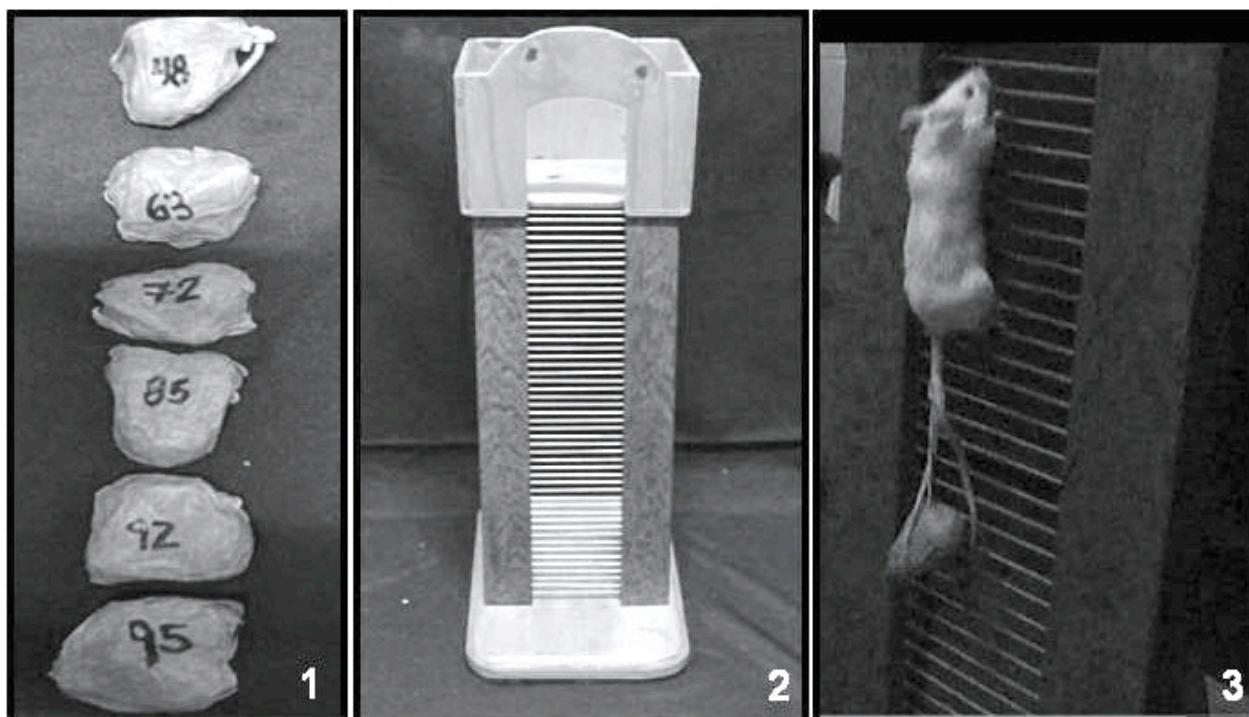


Figura 3. Foto representativa do modelo de exercício resistido por escalada. Imagem 1 representa pesos de chumbo graduado em gramas envolto por uma fita adesiva (ordem aleatória). Imagem 2, escada de exercício composta por 50 degraus de 1cm de espaço entre eles. Imagem 3 representa o momento de escalada do animal com peso acoplado a cauda.

4.3.3 Protocolo de exercício combinado

Os grupos C e CM, submetidos ao protocolo de exercício combinado, realizaram sessões intercaladas de protocolos de exercício aeróbio e exercício resistido separados por um período de 24h entre cada sessão, sendo três vezes na semana do protocolo aeróbio e duas vezes na semana o protocolo resistido, durante oito semanas, totalizando 24 e 16 sessões de cada, respectivamente, uma vez que não houveram sessões nos fins de semana.

4.4 Curva de desempenho e aumento de carga

Ao final do experimento, foram obtidos dados da evolução de carga das sessões de treinamento dos grupos R, RM, C e CM. Estes dados permitiram traçar duas curvas, sendo a primeira referente à carga total em cada sessão e uma segunda curva referente a carga semanal de cada grupo ao longo do estudo. Em virtude do protocolo ser individualizado para cada animal, esses dados nos permitiu estimarmos a adaptação desses animais frente ao protocolo.

4.5 Coleta do material

Após 48 horas da última sessão de treinamento, os animais foram submetidos a eutanásia por câmara de CO₂. Antes da eutanásia o sangue foi retirado por punção jugular com seringa BD ultra-fine II[®] (1 ml) e agulha de 8mm comprimento (5/16”) por 0,3mm de largura. O sangue foi armazenado em micro tubos eppendorf[®] de 1 ml e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o soro foi cuidadosamente coletado e congelado a -80°C para futuras análises.

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à toracolaparotomia mediana para o inventário das cavidades torácicas com a coleta do cólon e do fígado, que foram isolados, retirados e lavados com solução salina (soro fisiológico a 0,9%). O fígado foi partido ao meio direcionando um lobo hepático para o processamento histológico e a outro para congelação. O cólon foi aberto longitudinalmente pela sua borda mesentérica, lavado novamente em solução salina e dividido em partes distal destinado à histologia e proximal destinado à congelação. Os músculos gastrocnêmio e sóleo foram isolados do membro traseiro, e o bíceps e tríceps isolados do membro dianteiro do mesmo lado, coletados, lavados em solução salina, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posteriores análises. A escolha dos músculos bíceps e tríceps objetivou mensuramos as respostas musculares nos membros anteriores e posteriores, visto que os protocolos de exercício empregados ativavam ambos os membros, além disso, o volume desses músculos teriam maiores pesos para as dosagens bioquímicas se comparado ao grupo dos músculos flexores e extensores de dedos de camundongos.

4.6 Processamento histológico

Após a coleta, o fragmento distal do cólon foi estendido entre duas placas de papelão com a mucosa voltada para cima protegida com papel de seda e imerso em formalina tamponada a 10% durante um período mínimo de 24 horas e máximo de 5 dias para fixação. O seguimento do fígado destinado a histologia seguiu o mesmo tempo de fixação com o mesmo fixador. Após o período de fixação, os tecidos foram retirados da formalina, recortados em fragmentos de aproximadamente de 2 cm e armazenadas em placas de processamento histológico

Em seguida, as peças foram desidratadas por submersão em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%) em um tempo de 60 minutos para cada graduação alcoólica. Posteriormente, para a diafanização do material, as mesmas foram submersas em banhos de xilol (Merck) 100% por aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Em seguida, as amostras foram

embebidas em banho de parafina líquida em uma temperatura de 60°C por um período de 4 horas, seguindo então para a inclusão em blocos, onde cada amostra foi incluída horizontalmente com a mucosa para baixo e verticalmente para a obtenção de cortes longitudinais e transversais, respectivamente.

4.6.1 Determinação da morfologia muscular do gastrocnêmio

O gastrocnêmio foi o músculo escolhido por apresentar uma boa área de secção transversa para a contagem das fibras e ser de fácil acesso de isolamento durante o procedimento cirúrgico. Secções histológicas transversais de 5µm do gastrocnêmio foram obtidos com micrótomo HM 505 E (Microm International, GmbH, Walldorf, Alemanha) acoplado a um criostato a -25°C. As lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina-eosina (H&E) através de banho de imersão em Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra coradas com a solução de Eosina Floxina alcoólica por 30 segundos em pH a 4.3.

A análise morfológica e aquisição de imagens dos cortes foram realizadas com o microscópio óptico Leica DM 2500 (Leica DM 2500, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Alemanha) acoplados a uma câmera Leica DC 300 FX. As imagens foram adquiridas em um aumento de 400x e posteriormente foi utilizado o software Image Processing and Analysis in Java (ImageJ), feito o download em <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>. para a determinação da área de secção transversa, foram considerados uma média de 150 fibras por animal (Nascimento et al. 2008) ao qual obtiveram a área de secção transversal de cada fibra circulada e obtido um escore ao final da análise.

4.6.2 Determinação dos FCAs no cólon

Blocos parafinados com cortes longitudinais a superfície da mucosa colônica foram cortados em um micrótomo para obtenção de corte de 4µm de espessura e posteriormente montados em lâminas. As lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina-eosina (H&E) através de banho de imersão em Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra coradas com a solução de Eosina Floxina alcoólica por 30 segundos.

Para determinação dos FCAs, foi realizada a análise histológica dos cortes corados com H&E utilizando-se microscópio óptico com aumento para identificação, quantificação e caracterização dos FCAs. Somente os FCAs displásicos foram considerados segundo critérios

histomorfológicos estabelecidos por Paulsen et al. (2005); Norlida & Phang (2010). Dentre os critérios estabelecidos de cripta displásica estavam o núcleo alongado ou aumentado, pseudoestratificação ou perda de polaridade e redução ou ausência de células caliciforme, sendo seu resultado expresso por unidade de área em cm^2 . Uma vez localizado os FCAs displásicos, o número de criptas por foco eram contados (multiplicidade) considerando que focos maiores apresentaram maior malignidade (Bird 1995; Takayama et al. 1998).

4.7 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram feitas em cortes histológicos transversais do cólon através da reação antígeno-anticorpo, seguida da reação com marcador visível ao microscópio. Para a marcação dos cortes histológicos, foram obtidos cortes de 5 μm de espessura, aderidos em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Após resfriamento, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da aplicação de peróxido de hidrogênio a 3% ao qual foram adicionados os anticorpos primários, Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Clone PC10, marca Abcam®, diluição 1:100 e Metalotioneína (Anti-MT), clone UC1MT, marca Abcam®, diluição de 1:100. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada, foram adicionados o reagente secundário (Biotinilado anti-mouse Ba 2000-Vector) incubando por 60 minutos. A reação foi revelada com cromógeno Diamino Benzidina DAB (Sigma Co., S. Louis, EUA) por cinco minutos e a marcação positiva apresentava coloração marrom contra corada com hematoxilina por dois minutos.

A quantificação das células positivamente marcadas se deu com o auxílio do microscópio óptico da marca Zeiss. No caso da contagem do PCNA, obtivemos um índice entre o número de células marcadas pelo total de células na cripta (Kannen et al. 2011). Para a quantificação da imunomarcação de Metalotioneína, consideramos apenas as criptas com toda sua dimensão marcada e obtivemos um escore do total de criptas marcadas por área de campo.

4.7 Análises Bioquímicas

Os produtos de peroxidação lipídica Malondialdeído (MDA) e Espécies Reativas de ácido Tiobarbitúrico (TBARS) foram dosados no fígado e soro, respectivamente. Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foram dosados no músculo, no fígado e no cólon e os

hidroperóxidos lipídicos, pela técnica da oxidação do Ferro em xilenol laranja (FOX) foram dosados também no músculo esquelético, pelas técnicas detalhadas abaixo.

4.7.1 Determinação do MDA

A concentração de MDA hepático foi determinada por espectrofotometria como proposto por (Gerard-Monnier et al. 1998), com algumas adaptações. Para a dosagem de MDA foi pesada uma amostra de 200mg de tecido hepático o qual foi homogeneizado em 1ml de tampão fosfato (PBS), 0,2 M pH 7.4. Desse homogenato foram retirados 200 μ l e transferidos a um eppendorf de 1,5ml, marca SPlabor. A este foi adicionado 650 μ l de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150 μ l de ácido clorídrico (HCl) puro (37%). Logo após, os eppendorfs foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida os eppendorfs foram centrifugados a 4000rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorvância com comprimento de onda de 586nm em um espectrofotômetro, modelo SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA. Os valores de absorvância foram padronizados pela equação da curva da reações e depois corrigidos pela concentração de proteínas de cada amostra, sendo seu resultado expresso em nmol/mg.

4.7.2 Determinação do produtos reativos do ácido tio-barbitúrico (TBARS)

A concentração de TBARS no soro foi determinada segundo método de Costa et al. (2006) e Spirlandeli et al. (2014). Os reagentes HCl e o ácido tricloroacético (TCA) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro) e ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o Malondialdeído Tetrabutylamônio foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA) e usados segundo recomendação padrão. Para preparação da amostra, 100 μ L de soro foi misturado com 1mL de solução contendo 15% de TCA, 0,38% de TBA 0,25M de HCl. A mistura foi aquecida a 100°C por 30 minutos e então resfriada em gelo por 2 minutos. Depois de centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm, a absorvância do sobrenadante foi medida a 532nm através do espectrofotômetro, modelo SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA. Os valores de absorvância foram padronizados pela equação da curva da reações e depois corrigidos pelo volume de cada amostra em duplicata, sendo seus valores obtidos expressos em μ mol/L.

4.7.3 Determinação de hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos são produtos primários da oxidação de ácidos graxos polinsaturados (Yamamoto et al. 1987) e foram determinados pelo método de oxidação dos íons férrico na presença de xilenol laranja (técnica FOX), em que 1 ml de solução contendo 100µmol/L de xilenol laranja, 4mmol/L de hidroxitoluenobutilato (BHT), 25 mmol/L de ácido sulfúrico e 250µmol/L de sulfato ferroso em metanol: água (9:1 v/v), todos da marca Merck Milipore, foram adicionados à uma alíquota de 100µL de homogenato muscular de bíceps e tríceps. Após agitação e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm a uma temperatura de 4°C . A absorbância do sobrenadante foi lida em 560nm e comparada com a curva padrão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em espectrofotômetro, modelo SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA. Os valores de absorbância foram padronizados pela equação da curva da reação e depois corrigidos pela concentração de proteínas de cada amostra, sendo seus valores expressos em mmol/gP.

4.7.4 Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)

A dosagem de AOPP foi realizada pelo método de Valli et al. (2007); Anderstam et al. (2008) que minimizam a interferência dos triglicérides na análise. Logo, 10µl de amostras do músculo, fígado e cólon foram diluídas em PBS (1:10) e em seguida 10µl de potássio iodado (KI), 1.16M foram adicionados a amostra. O PBS para o branco e o PBS + KI foram utilizados como branco e padrão da reação e as amostras foram agitadas durante 6 minutos em Vortex agitador de tubos marca Phoenix. Ao final, 20µl de ácido acético puro foi adicionado em cada amostra. A leitura foi realizada em triplicata com comprimento de onda de 340nm através de um espectrofotômetro modelo SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA. Os valores de absorbância foram padronizados pela equação da curva da, corrigidos pela diluição e depois obteve-se a média entre a triplicata sendo seus valores expressos em µM

4.7.5 Determinação os indicadores antioxidantes

4.7.5.1 Determinação da Glutathiona total (GSH + 2 GSSG)

A glutathiona total (GSH + GSSG) foi determinada no soro pelo método de (Rahman et al. 2006). Em condições normais, a glutathiona nas células de mamíferos se encontra predominantemente em sua forma reduzida (90-95%). Para tal foi utilizado o kit para análise de Glutathiona (Sigma-Aldrich®), sendo que 100 µL de amostra foi desproteïnizada com 5% de solução ácido 5-sulfolásílico, centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi separado e mantido em temperatura de 0-4°C. A quantidade de GSH da amostra reage com com 5,5'-diti-biois-2-ácido nitrobenzóico (DTNB, Sigma). Esta reação produz 5' thio-2-acido nitrobenzóico (TNB), que é lida a um comprimento de onda de 412nm no espectrofotômetro acima descrito, e glutathiona oxidada-TNB (GS-TNB) que também gera um valor positivo na reação. A amostra usa a curva padrão da glutathiona reduzida para determinar a quantidade de glutathiona no tecido biológico sendo seu resultado expresso em mmol/L.

4.7.5.2 Glutathiona Reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A glutathiona reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG) e sua razão GSH/GSSG foram determinadas no tecido hepático como indicadores da capacidade redutora da célula pela glutathiona (Owen & Butterfield 2010) de acordo com Rahman et al. (2006) por método colorimétrico acima descrito. A quantificação de proteínas dos homogenatos foi determinada utilizando método descrito por Lowry et al. (1951).

Para tal amostras de fígado (100mg/ml para a glutathiona total e 200mg/ml para a glutathiona oxidada) foram homogenizadas em gelo com 5% solução de ácido metafosfórico (Sigma-Aldrich) e centrifugados a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e mantido em temperatura de 0-4°C. Tampão KPE (0,1M tampão fosfato de potássio com 5mM de sal dissódio EDTA, pH7,5) foi usado como diluente do DTNB (0,67 mg/ml preparado em KPE) e GR (40µL de GR diluído em 3ml de KPE). Um total de 20 µL de cada amostra, branco e padrão foi adicionada a 120µL de uma mistura de volumes iguais de solução concentrada de DTNB (60µL) e solução concentrada de GR (60µL) foram adicionados em cada poço de sendo que a reação ocorreu por 30s. A absorbância foi lida em 412nm em um leitor específico (SpectraMax® M5 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) A cada 30 segundos de um total de 5 minutos depois de adicionado os 60µL de 0.67 mg/mL β-NADPH em KPE. A taxa de formação de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico foi usado para calcular a

concentração total de glutathione a partir de uma curva padrão de GSH. Para o ensaio de GSSG, 2 mL de 2-vinilpiridina (Sigma-Aldrich) foi adicionado a 200 ml de homogenato de fígado, e a reação foi deixada continuar durante 2 h, no escuro. Subsequentemente, 20 µL do homogeneizado foi adicionada a cada poço, como descrito acima. A concentração de GSSG foi calculado como a taxa de formação de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico com base numa curva padrão de GSSG. A GSH reduzida foi calculada como a glutathione totais - valores de GSSG, e os resultados foram expressos como o tecido mmol/g. O coeficiente de intra-ensaio de variação de glutathione reduzida e oxidada foi de 1,6%, e a sensibilidade do ensaio foi de 7,8 pM / g de tecido.

4.7.5.3 Determinação da atividade da Catalase

A expressão proteica da catalase, enzima antioxidante de ação redutora dos peróxidos de hidrogênio, foi determinada por Western Blotting no músculo sóleo. O sóleo, ao contrário da maioria dos músculos em camundongos, apresentam alta proporção de fibras tipo I e tipo IIA, que é similar ao composição de humanos (Timson et al. 1985; Carroll et al. 2011). Alíquotas de lisato celular desse músculo (25µg de proteína) foram resuspendidas em tampão de Laemmli. 5X (Tris HCl 0,5M, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, bromofenol blue 0,5%, glicerol, β-mercaptoetanol 5%). O tampão Laemmli contém SDS (dodecil sulfato de sódio) para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra.

As proteínas foram separados por Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). Este método baseia-se na migração das proteínas quando submetidas a um campo elétrico. Essa migração pode ser feita baseada na massa molecular, carga, formato ou interações com outras moléculas como descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite desnatado 5%, lavado com TBST (10mM tris HCl, 100mM NaCl, 0,02% Tween 20) e incubados overnight a 4°C com diluições próprias ao anticorpo primário anti-catalase, clone CAT-505, da marca Sigma e utilizado como proteína de referência a β -actina, clone AC-74, da marca Sigma. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBST por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário conjugados a horseradish peroxidase (HRP), marca Santa Cruz biotechnology®, por 45 minutos. A proteína foi visualizada pelo aumento da quimioluminescência e quantificadas por densitometria corrigidos pela concentração de β -actina

4.7.5.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT) baseado no ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi determinada no soro pelo método de Erel (2004a); Erel (2004b), que se baseia no embranquecimento da cor característica de um radical catiônico mais estável de 2,2"-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) pelos antioxidantes. O método de CAT são colorimétrico e a mudança de cor foi captada pelo espectrofotômetro acima descrito no comprimento de onda de 660nm. Os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox./L.

4.8 Dosagens enzimáticas

4.8.1 Creatina kinase

A creatina kinase (CK) total plasmática foi determinada pelo Kit comercial LABTEST®; Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. A velocidade de incremento na absorbância em 340 nm, lido no espectrofotômetro acima descrito, é proporcional à atividade da CK na amostra. Cada 10 μ L da amostra (soro) são combinados a 500 μ L do reagente presente no kit. A reação entre o kit e a amostra dura 4 minutos e o equipamento de espectrofotometria faz a leitura a cada 1 minuto sendo coletado seus valores no minuto 2 e 4. A média entre esses valores é dividida pelo valor do padrão da amostra e multiplicado pelo valor indicado pelo fabricante. O resultado de é expresso em U/L.

4.8.2 Citrato sintase

A dosagem da enzima citrato sintase (CS), reconhecido marcador da adaptação oxidativa ao exercício (Pinho et al. 2006), foi realizada no homogeneizado do músculo sóleo dos animais, em espectrofotômetro acima descrito conforme método de Srere (1963). O músculo sóleo foi homogeneizado com PBS na proporção de 1:10 (1g de tecido: 10 ml de PBS). As amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm, durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado para medida da atividade enzimática.

A cinética enzimática foi determinada pela quantificação da intensidade de cor formada pela reação entre a coenzima A (CoA) e o ácido oxalacético na presença do ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzoico (DTNB). A leitura foi realizada a 25°C, durante um intervalo de 160 segundos, em 412 nm. A atividade da enzima foi determinada pela diferença entre a absorbância inicial e a final, dividida pela diferença de tempo de absorbância. Os resultados foram expressos $\mu\text{mol/mL/mg}$ proteína. A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando como padrão albumina bovina (BSA, 1 mg/mL).

4.9 Dosagem de citocinas

As interleucinas (IL-10 e IL-12), Interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α foram dosadas a partir de homogenato de tecido colônico. Aproximadamente 100mg de tecido foram homogeneizados em 1ml de solução PBS contendo inibidores de proteases, marca Roche. O material foi centrifugado a 4000 rpm, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o momento da dosagem. As citocinas foram dosadas pela técnica de ELISA, com kit BD OptEIA™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA) segundo protocolo do fabricante. Os resultados foram analisados considerando o valor absorbância de cada amostra, obtidos no comprimento de onda de 540nm, e cada valor considerado na curva de equação da reta e, ao final, corrigidas pelo peso inicial da amostra, sendo o resultado expresso em ng/ml/g.

4.10 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando o software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia). Foi utilizado o teste de kolmogorov-smirnov para identificar o padrão de normalidade das amostras. Para verificar as diferenças entre as médias dos grupos quando considerado apenas um fator, utilizou-se a análise de variância em uma via (one-way) quando a

distribuição dos dados seguia um padrão de normalidade ou teste de Kruskal-Wallis quando as amostras não seguiam um padrão de normalidade. A análise das médias pela variância em duas vias (Two-way ANOVA) foi considerada quando dois fatores poderiam interagir na determinação de uma variável. Foi adotado um nível de significância de 0,05; e a média foi dada \pm desvio padrão da média (SD). Quando se verificou diferença entre as médias ($p < 0,05$), foi utilizado pós-teste de tukey's (one-way ANOVA), Dunn's (Kruskal-Wallis) e bonferroni (two-way) sendo todos os testes comparados com os grupos sedentários, S e SM.

5. RESULTADOS

5.1. Estado geral dos animais e taxa de mortalidade

O estado geral dos animais foi obtido através da pesagem inicial, final, variação do peso e a taxa de mortalidade ao longo do estudo como é mostrado na tabela 2. Podemos observar que os grupos combinados, C e CM, e o grupo AM tiveram menor ganho de peso comparados aos seus controles sedentários, S e SM. Em relação a taxa de mortalidade, observamos que os grupos C (50%) e CM (37,5%) tiveram uma maior taxa de mortalidade ao longo do estudo, seguidos do grupo AM (25%) e do grupo RM (12,5%). Dentre os motivos observados que levaram a essa mortalidade, observamos que dois animais morreram, um do grupo RM e um do grupo CM, em decorrência de complicações da aplicação do carcinógeno e quatro animais do grupo C, dois do grupo AM, e dois do grupo CM morreram durante a prática da natação.

Tabela 4. Estado geral dos animais no início e ao final do estudo

grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	Mortalidade (%)
S	23,83 \pm 1,16	25,5 \pm 1,61	+1,66 \pm 1,67	zero
A	29,37 \pm 1,40	28,12 \pm 1,55	-1,25 \pm 1,90	zero
R	25,75 \pm 3,77	29,37 \pm 4,67	+3,62 \pm 2,66	zero
C	28,75 \pm 2,04	24,75 \pm 0,95	-4,00 \pm 1,22**	50
SM	26,25 \pm 2,96	31,00 \pm 2,39	+4,75 \pm 3,09	zero
AM	26,16 \pm 2,99	26,33 \pm 1,69	+0,16 \pm 3,98*	25
RM	27,42 \pm 4,42	29,14 \pm 4,67	+2,66 \pm 2,80	12,5
CM	27,62 \pm 1,20	23,79 \pm 0,4	-4,00 \pm 1,22***	37,5

* $p < 0,05$ versus grupo SM, ** $p < 0,01$ versus grupo S, *** $p < 0,001$ versus grupo SM.

5.2 Aumento de cargas e análise de hipertrofia muscular

A curva do aumento de cargas foi obtida nos grupos R, RM, C e CM. As figuras 3A e 3B representam a carga total em cada sessão, indicando que não houve diferença entre os grupos controles e controles + MNNG sobre o aumento contínuo de carga por sessão. Ao passo que as figuras 3C e 3D representam a média semanal dos grupos R versus C e RM versus CM, sendo que a média de carga semanal dos grupos R e RM foi significativamente maior que as do grupo C e CM na semanas seis e oito.

Para analisar diferenças estruturais no músculo esquelético em resposta aos protocolos de exercício, realizamos a análise da área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio como uma consequência sugestiva de hipertrofia de suas fibras musculares. Nossos dados mostraram que não houve diferença entre os protocolos de exercício comparado aos grupos sedentários. Contudo, observamos um aumento de 37 % na área de secção transversa muscular do grupo R comparado ao grupo S (grupo R, $2,62 \pm 0,82 \text{ mm}^2$ versus grupo S, $1,91 \pm 0,55 \text{ mm}^2$, $p > 0,05$), figura 4.

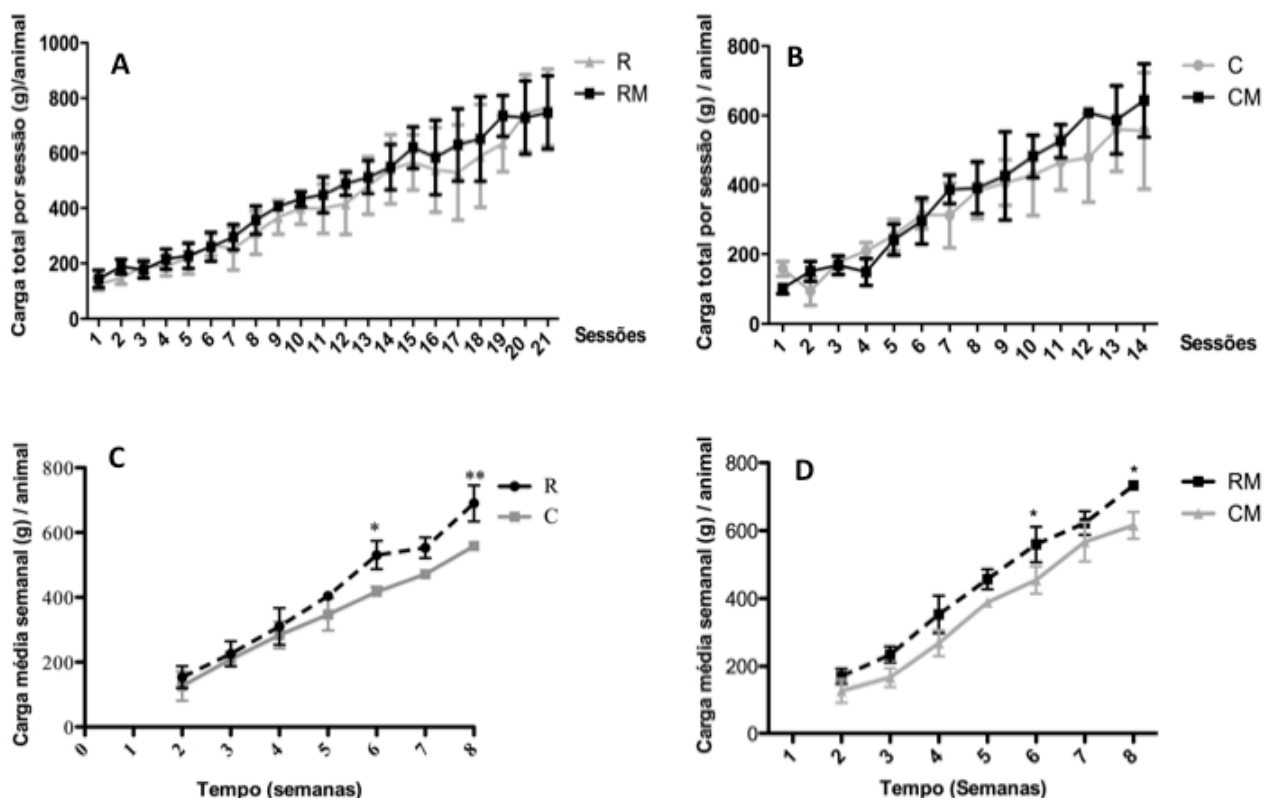


Figura 3. Gráficos do acréscimo de carga dos grupos experimentais submetidos ao protocolo de exercício resistido. Figuras 3A e 3B, carga total por sessão dos grupos R e RM e C e CM, respectivamente. Figuras 3C e 3D representa a média das cargas semanais por grupo. Note que a primeira semana era as cargas eram nulas pois correspondeu a semana de adaptação sem peso adicional. Dados são expressos em média±desvio padrão, R, grupo resistido n=8; RM; grupo resistido + MNNG, n=7; C grupo combinado n=4 e CM, grupo combinado + MNNG, n=5. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni, Figura 4 C, * $p < 0,05$ em relação ao grupo C na semana 6 e ** $p < 0,01$ versus grupo C na semana 8. Figura 4D, * $p < 0,05$ versus grupo CM nas semanas 6 e 8.

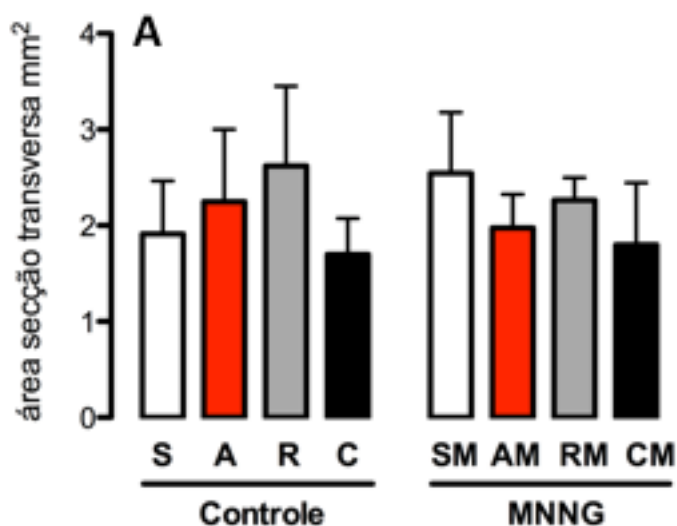


Figura 4. Área de secção transversa do músculo gastrocnêmio em mm^2 . S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5. valores são expresso em média ± desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni

5.3 Marcadores de estresse oxidativo e atividade enzimática do músculo esquelético

O marcador de peroxidação proteica AOPP e a quantidade de hidroperóxidos lipídicos pela técnica do FOX foram dosados nos músculos bíceps e tríceps do membro anterior de nossos grupos experimentais. Nossos dados revelaram que o grupo CM apresentou maiores níveis de AOPP ($p < 0,05$, figura 5A) sugerindo maiores níveis de peroxidação proteica neste grupo, ao passo que o grupo RM obteve menores níveis de hidroperóxidos lipídicos ($p < 0,05$, figura 5B), ambos comparados ao grupo sedentário + MNNG.

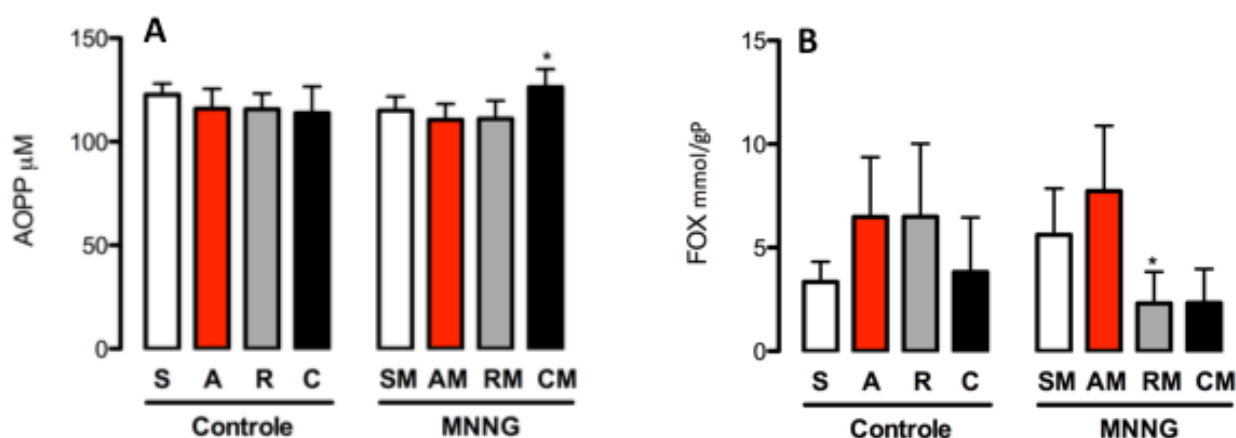


Figura 5. Análise dos produtos de peroxidação proteica (AOPP, figura A) e hidroperóxidos lipídicos (FOX, figura B) no músculo bíceps e tríceps braquial dos grupos experimentais. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5. valores são expresso em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ versus grupo SM.

Em sequência aos parâmetros de produtos de peroxidação no músculo, nosso estudo obteve dados referentes a atividade das enzimas CS e da catalase, ambos no músculo sóleo. A análise da expressão proteica da catalase nos grupos experimentais revelou que os protocolos de exercício favoreceram de forma significativa ($p < 0,001$) sua expressão comparados aos grupos sedentários, sem diferenças entre os protocolos (Figura 6A). Contudo, observamos que o aumento da atividade de CS solear esteve predominantemente correlacionada com os protocolos que envolveram a combinação das modalidades exercício aeróbio combinada ao modelo resistido, grupos C (31% versus S) e CM (82% versus SM), no entanto, somente o grupo CM apresentou diferença estatística comparado ao grupo SM, figura 6B.

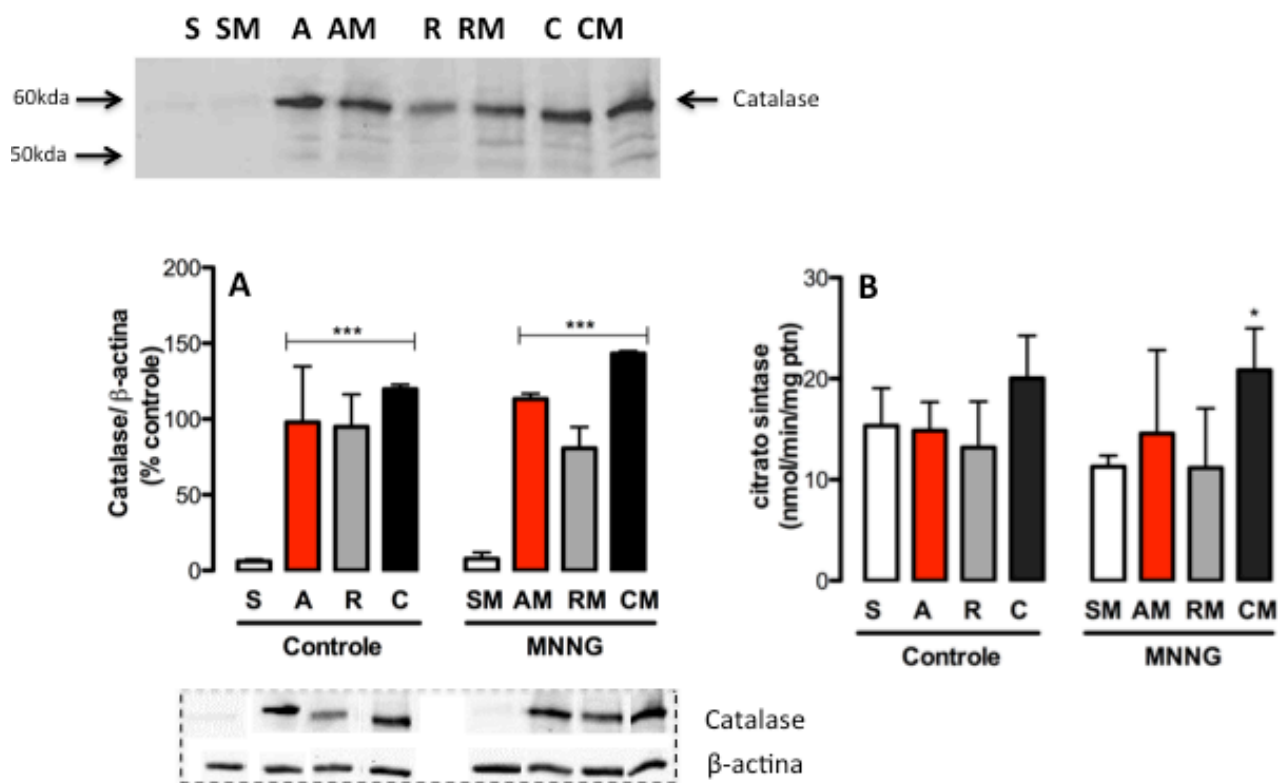


Figura 6. Análise enzimática no músculo sóleo dos grupos experimentais. Figura A análise enzimática da catalase em relação ao controle β -actina e figura B atividade de citrato sintase (CS). Note que a disposição dos grupos no gráfico se encontra diferente das bandas de proteína no gel, como demonstra as bandas recortadas abaixo da figura 6A. Dados são expressos em média \pm desvio padrão, n=4. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ versus grupos S e SM; * $p < 0,05$ versus grupo SM.

5.4. Marcadores de estresse oxidativo sérico

No presente estudo, realizamos a dosagem de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da creatina kinase (CK) como marcadores de peroxidação lipídica dano oxidativo e muscular, respectivamente, e a dosagem da glutathiona total e da capacidade antioxidante total (CAT) equivalente ao Trolox como marcadores do estado *redox* do soro desses animais.

Nossos dados evidenciaram que os grupos AM e RM tiveram menores níveis séricos de TBARS, $p < 0,001$, comparados ao grupo SM (figura 7A). A análise dos protocolos de exercício sem MNNG, revelou que os níveis de CK aumentaram nos grupos submetidos aos protocolos resistido (R= $453,16 \pm 119,23$ U/L, 73%) e combinado (C= $392,11 \pm 73,73$ U/L) versus controle sem MNNG (S= $261,58 \pm 129,34$ U/L), 73% e 50%, respectivamente. Contudo esses valores não foram significativos, $p > 0,05$. Ao passo que os níveis séricos de CK foram 2x maior no grupo SM, comparado aos grupos exercícios + MNNG, $p < 0,001$. Em relação as defesas antioxidantes no soro, o protocolo resistido sem MNNG e o protocolo combinado de exercício em ambos os tratamentos

C e C+MNNG aumentaram de maneira significativa os níveis séricos de glutatona total ($p < 0,001$, figura 7C), ao passo que seus níveis de CAT foram significativamente menores somente nos grupos C e C+MNNG comparados aos seus respectivos grupos sedentários (figura 7D).

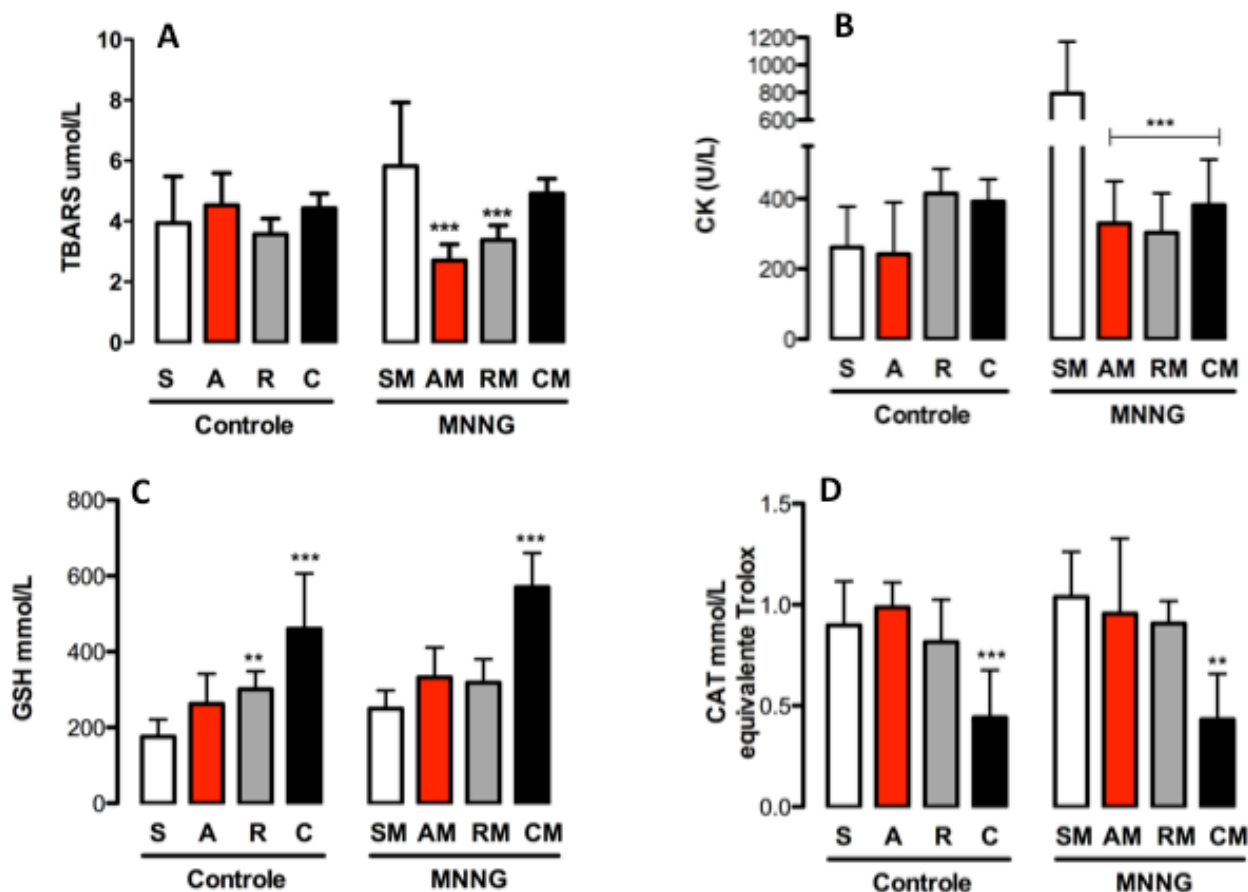


Figura 7. Marcadores do estresse oxidativo sérico. Figura A, peroxidação lipídica dosada pelas substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), figura B, níveis séricos de CK; figura C níveis de GSH e figura D representa os níveis de CAT. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5. valores são expresso em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni. Figura 9A, *** $p < 0,001$ versus grupo SM, figura 9B *** $p < 0,001$ versus grupo SM, figura 9C, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus grupo S e SM; figura 9D, *** $p < 0,001$ versus grupo S e $p < 0,01$ versus grupo SM.

5.5 Marcadores do estresse oxidativo hepático

O balanço do estresse oxidativo hepático foi obtido pelos marcadores de peroxidação, MDA e AOPP, e correlacionados com os níveis de GSH e sua razão GSH/GSSG no tecido. A quantidade de produtos de peroxidação proteica indicada pelo AOPP (figura 8 A) demonstrou que os níveis de AOPP nos grupos R e ambos os grupos combinados, C e CM, foram maiores

comparado aos grupos S e SM. Contudo, os níveis de MDA se mostraram elevados de forma significativa somente nos grupos de exercício sem MNNG (grupos Controle), figura 8B.

As figura 8C e 8D demonstraram que a redução significativa de GSH pelos protocolos de exercício (figura 8C), só não foi contrabalanceada pela redução de GSSG e assim manter sua razão estável comparado ao controle no grupo RM, $p < 0,05$, comparado ao grupo SM, figura 10D, indicando uma maior concentração de GSSG neste grupo.

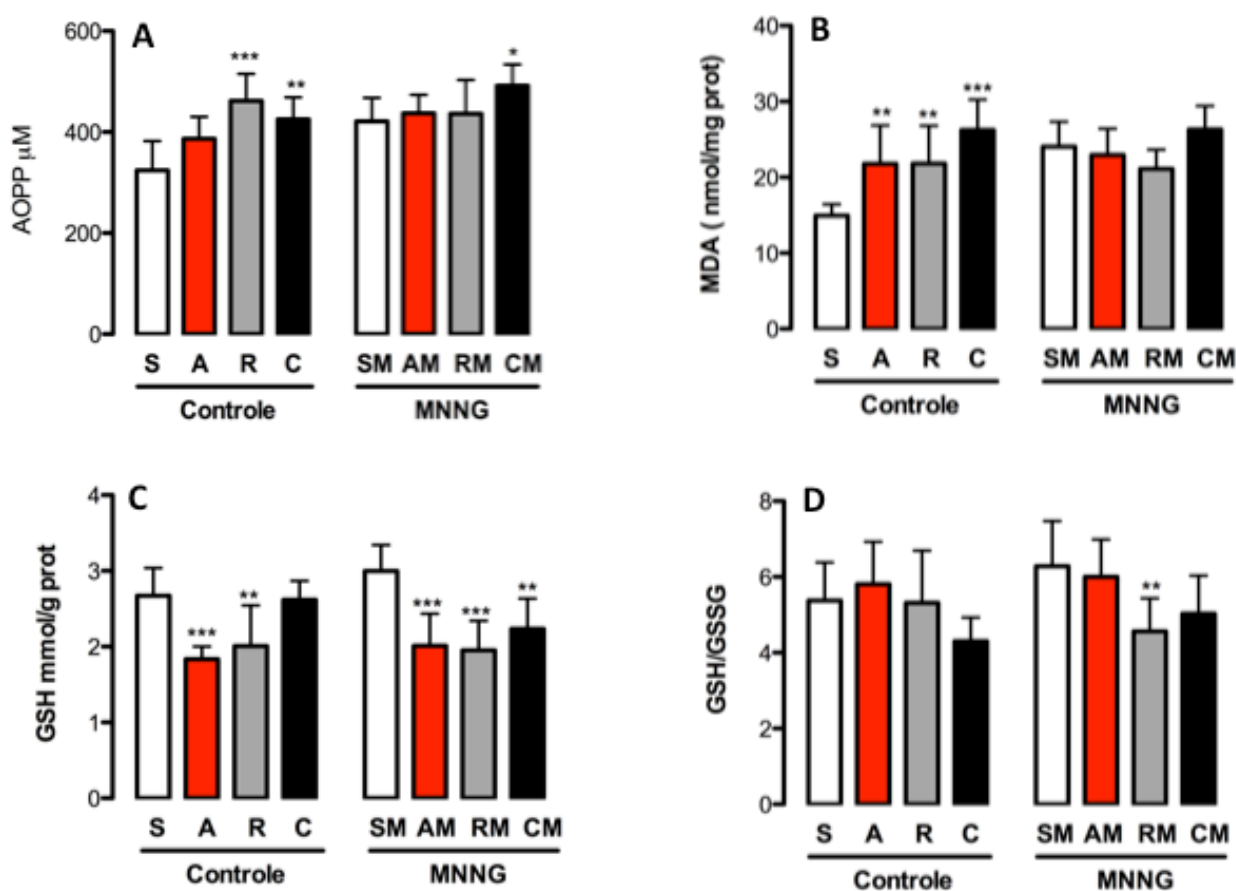


Figura 8. Marcadores de estresse oxidativo hepático. As figuras A e B representam marcadores de peroxidação proteica e lipídica, respectivamente e as figuras C e D indicam os níveis e o estado de glutatona nos hepatócitos. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5. valores são expresso em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ versus grupo S ou SM, ** $p < 0,01$ versus grupo S ou SM e * $p < 0,05$ versus grupo S ou SM.

5.6 Marcadores do estresse oxidativo do cólon

O marcador de peroxidação proteica AOPP também foi dosado no tecido colônico. A

figura 9 demonstra que os níveis de AOPP no grupo aeróbio sem aplicação do MNNG (grupo A) foi menor, $p < 0,05$, comparado ao sedentário S, enquanto que não houve diferença significativa nos grupos exercícios com aplicação de MNNG.

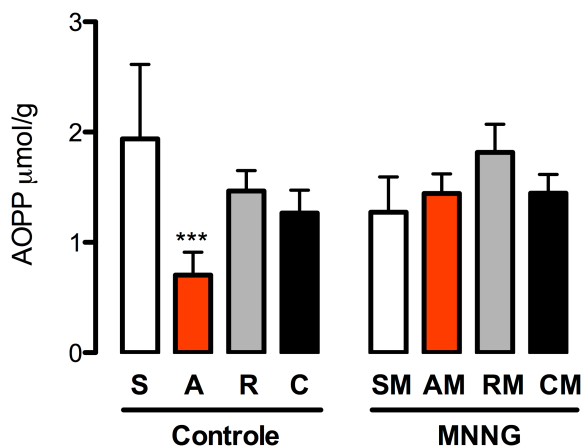


Figura 9. Análise dos produtos de peroxidação proteica (AOPP) no cólon dos grupos experimentais. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5. valores são expresso em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ versus grupo S.

5.7 Análise dos marcadores histopatológicos do cólon

A figura 10 I demonstra a formação de FCAs no cólon dos animais tratados com o MNNG, uma vez que não é esperado que os grupos sem ação do carcinógeno formem FCAs (Wali et al. 2002). Este dado demonstrou uma redução significativa dos FCAs no grupo submetido ao protocolo de natação, grupo AM ($p < 0,05$), enquanto que os grupos submetidos aos protocolos resistido (RM) ou combinado (CM) não alteraram a formação dessas lesões pré-neoplásicas. Em paralelo, a multiplicidade de focos com 4 ou mais criptas foram menores em 3,5 vezes comparado ao grupo sedentário (grupo AM, $0,25 \pm 0,5$ versus grupo SM $1,14 \pm 0,69$), no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,065$, figura 10 II.

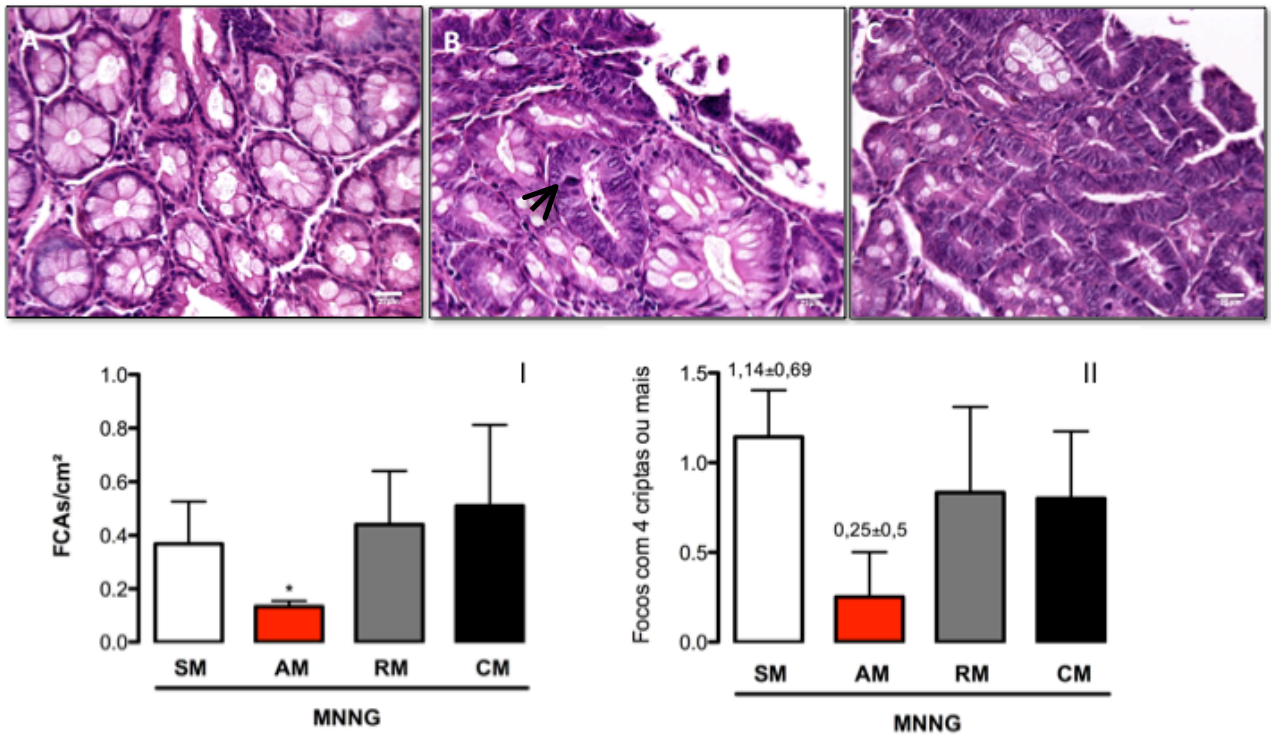


Figura 10. Figura ilustrativa da mucosa colônica corado com H&E e a formação e multiplicidade dos FCAs. A imagem A representa a mucosa colônica normal no grupo SM; a imagem B ilustra um foco de cripta aberrante (FCA) displásico isolado pertencente ao grupo RM; e a imagem C ilustra um FCA displásico com mais de 4 criptas pertencente também ao grupo RM. A seta preta na imagem B indica uma estratificação nuclear, característica de uma alteração displásica. Imagens foram obtidas no aumento de 400x e a escala representa o comprimento de 25 μ m. O gráfico I, número de FCAs por cm² e o gráfico II, focos com 4 ou mais criptas. SM, grupo sedentário + MNNG, n=8, AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5. Valores são expressos em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. * $p < 0,05$ versus grupo SM

Em sequência as alterações morfológicas do tecido colônico frente ao carcinógeno e aos tratamentos por exercício, foi conduzido uma reação de imunohistoquímica para o marcador PCNA e a MT com o objetivo de avaliarmos a taxa de proliferação e mutação de células tronco criptais, respectivamente. A análise semiquantitativa demonstrou que a taxa proliferativa criptal avaliada pelo PCNA no grupo AM foi menor em 45% comparado ao grupo SM, (grupo AM, $0,22\pm 0,06$ versus grupo SM $0,32\pm 0,15$), tal redução no entanto, não se mostrou estatisticamente significativa, $p>0,05$, Figura 11C. Em relação ao marcador MT, nossos dados demonstraram os grupos AM ($p<0,001$) e RM ($p<0,01$) tiveram uma redução significativa de marcação de MT comparados ao grupo SM, figura 11D.

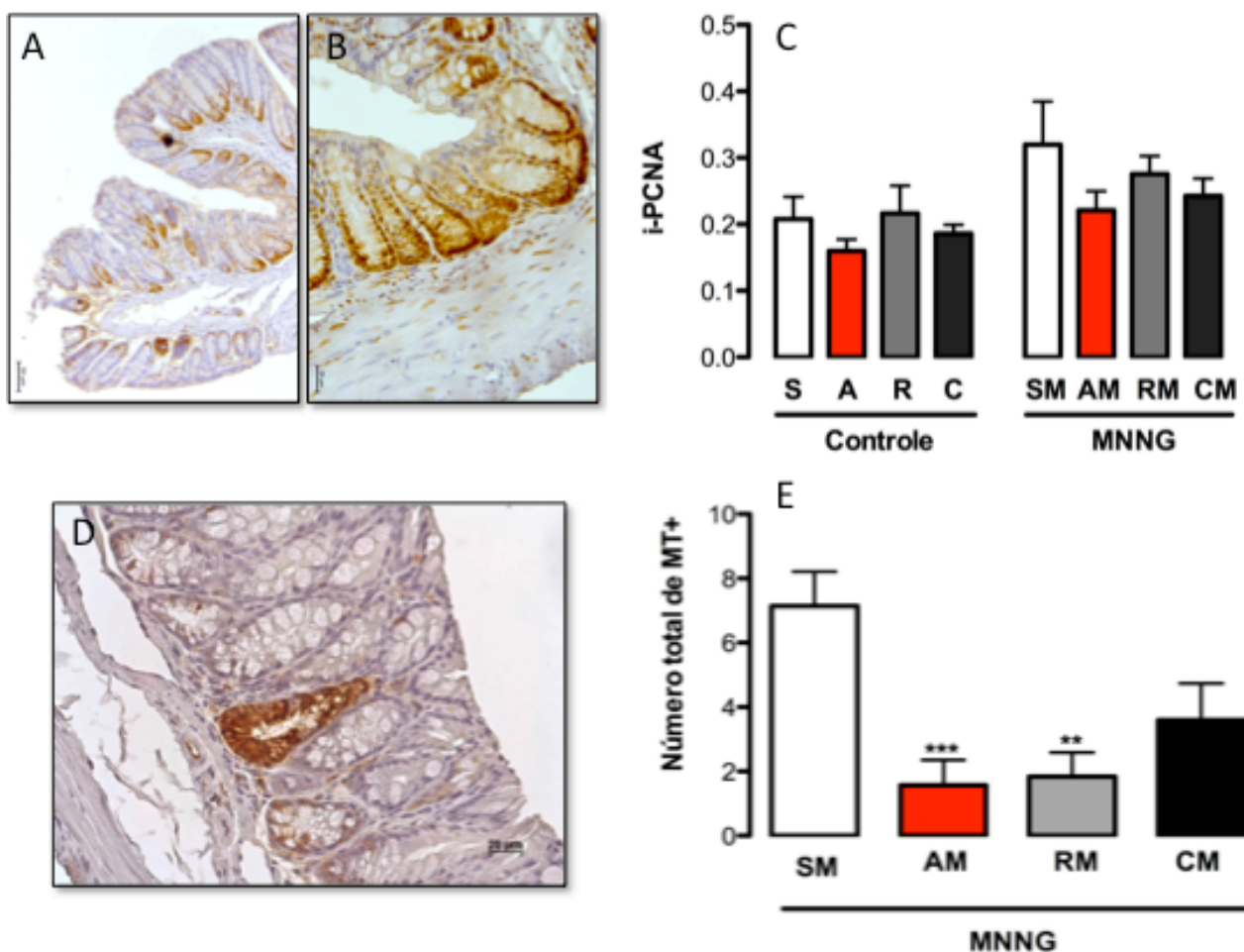


Figura 11. Figuras representativas da marcação positiva para PCNA e MT. A figura A é referente ao grupo S (sedentário sem MNNG), aumento de 200X, demonstrando uma marcação criptal normal para PCNA e a escala representa o comprimento de 50 μ m. A figura B é referente ao grupo SM (sedentário + MNNG), aumento de 400x, demonstrando uma marcação do terço basal e médio da cripta e a escala representa o comprimento de 20 μ m. A figura A ilustra a proliferação normal da camada basal da cripta ao passo que a figura B ilustra uma proliferação anômala do terço médio e distal da cripta. A figura C análise semi-quantitativa do índice de proliferação obtido pelo número de células marcadas pelo total de células na cripta. A figura D é referente ao grupo SM e

representa uma cripta corada em toda sua extensão pelo anticorpo anti-MT, aumento de 400x e a escala representa o comprimento de 20 μ m. A figura E contagem de criptas com marcação positiva de MT por campo histológico. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5., valores são expresso em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni para a figura 11C e Teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's para a figura 11E. ***p<0,001 *versus* grupo SM e **p<0,01 *versus* grupo SM.

5.7.1 Análise das citocinas no tecido colônico.

A dosagem das citocinas e interleucinas são mostradas na figura 12. A dosagem das citocinas inflamatórias IL-12, IFN- γ e TNF- α mostraram que a interação exercício + MNNG não alterou a concentração dessas citocinas no tecido colônico. Contudo, os grupos A e R apresentaram uma menor concentração de IL-12 e IFN- γ quando não expostos ao MNNG (grupos controle), figuras 12 A e B. O grupo C, no entanto, apresentou somente uma menor concentração de IL-12, comparado ao grupo S.

Em contrapartida, nossas análises demonstraram que o exercício aeróbio + MNNG (grupo AM) teve uma maior concentração de IL-10 no tecido colônico, p<0,001, comparado ao grupo SM, figura 12D.

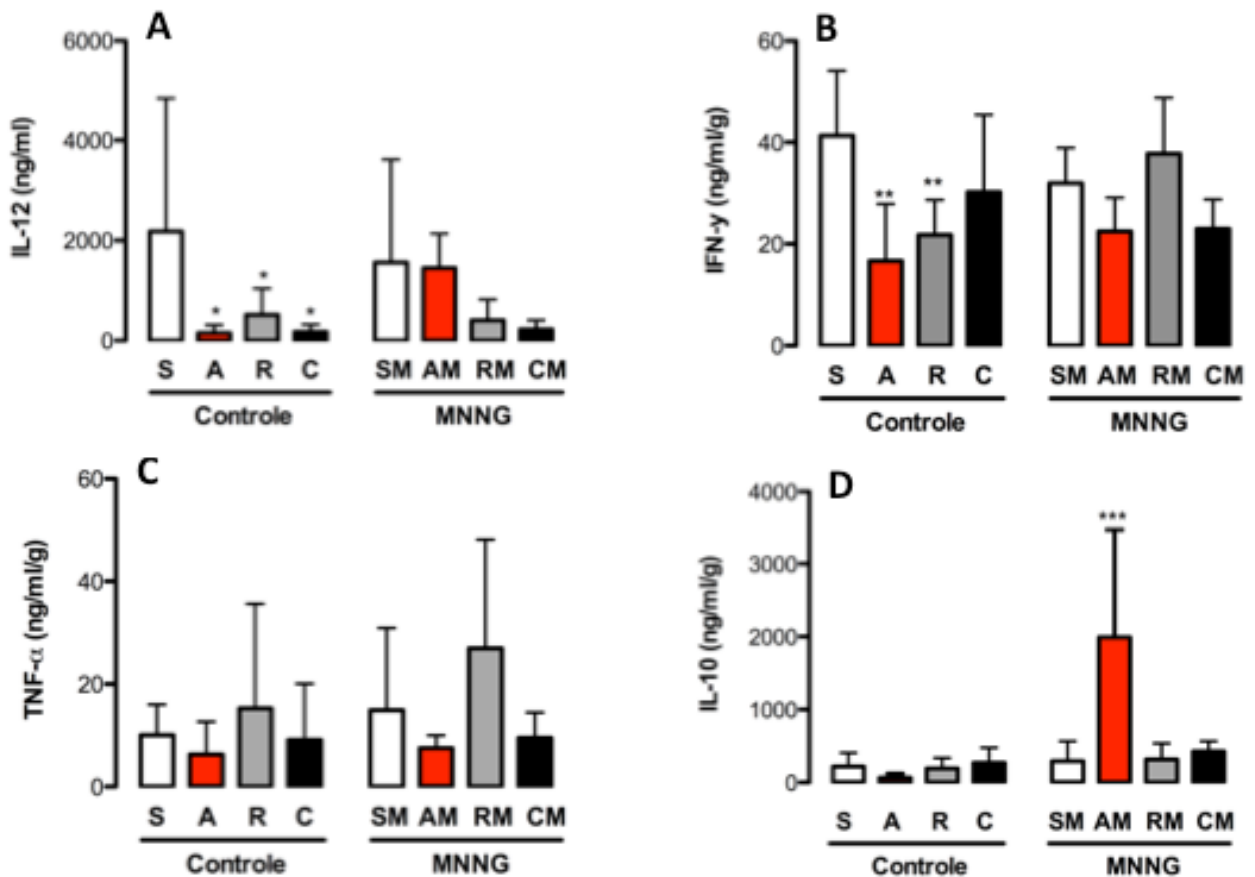


Figura 12. Concentração de citocinas no tecido colônico. A figura (A) concentração de IL-12, figura (B) concentração de IFN- γ , a (C) concentração de TNF- α . e a figura D concentração de IL-10. S, grupo sedentário, n=6; A grupo aeróbio, n=8; R grupo resistido, n=8; C grupo combinado, n=4; SM, grupo sedentário + MNNG, n=8; AM, grupo aeróbio + MNNG, n=6; RM, grupo resistido + MNNG, n=7, grupo CM, grupo combinado + MNNG, n=5., valores são expresso em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Two-Way seguido do pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ versus grupo S, ** $p < 0,01$ versus grupo SM e *** $p < 0,001$ versus grupo SM.

6. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos de três protocolos de exercício físico sobre formação e a caracterização de lesões pré-neoplásicas colônicas induzidas quimicamente. Nosso estudo evidenciou que somente o grupo submetido ao protocolo aeróbio isolado (grupo AM) diminuiu a formação e a multiplicidade dos FCAs induzidas pelo MNNG, adaptações estas que não ocorreram nos grupos submetidos aos protocolos resistido (grupo RM) ou combinado (CM) expostos ao mesmo carcinógeno, figura 10. Estes dados sugerem que além de um efeito intensidade-resposta pelo exercício, já observado na literatura (Demarzo & Garcia 2004;

Lunz et al. 2008; Silva et al. 2009), nossos dados indicam que o exercício apresenta ainda um efeito modalidade-dependente sobre a formação de lesões pré-neoplásicas de cólon.

A menor formação de FCAs e sua multiplicidade pelo exercício envolve a modulação de vários marcadores que favorecem o processo de malignização das lesões pré-neoplásicas do tecido colônico (Demarzo et al. 2008; Ju et al. 2008; Aoi et al. 2010; Buffart et al. 2014). A hiperproliferação e a expansão clonal de criptas alteradas são eventos significativos na evolução tumoral por refletir, de certa forma, que o tecido se encontra em um processo de crescimento desordenado (Nagel & Vallee 1995; Donnelly et al. 2005; Mori et al. 2012). Neste sentido, realizamos a imunomarcção para os marcadores PCNA e para MT como indicadores do controle proliferativo criptal e observamos que os protocolos de exercício não resultaram em uma diferença significativa sobre o índice de PCNA ao passo que os grupos AM e RM tiveram menor imunomarcção para a MT, comparados ao sedentário (SM), figura 11C e 11D. A menor marcação de MT pelos protocolos aeróbio e resistido na carcinogênese de cólon é um dado inédito de nosso estudo e sua interpretação deve ser analisada com cautela visto que alguns autores sugerem que a menor imunopositividade de MT no câncer de cólon não é um indicativo de melhor prognóstico (Ioachim et al. 1999; Dziegiel et al. 2003) enquanto outros apontam para uma relação inversa entre marcação de MT de pacientes com câncer de cólon e mortalidade (Hishikawa et al. 2001). Nosso estudo corrobora os dados de Donnelly et al. (2005) ao observar uma correlação direta entre a redução da imunomarcção de MT e menor formação de FCAs somente no grupo AM, enquanto que essa relação não se manteve no grupo RM. Logo, nosso estudo sugere os protocolos aeróbios ou resistido sejam alternativas biologicamente viáveis na redução de MT em etapas pré-neoplásicas; contudo, o impacto do exercício na regulação desse marcador sobre o desenvolvimento tumoral colônico requer maiores investigações.

Um único trabalho investigou os efeitos do exercício aeróbio de natação sobre marcação de PCNA do cólon de ratos expostos ao carcinógeno químico, no caso o DMH, e os autores demonstraram que houve uma menor marcação de PCNA em resposta ao exercício de natação (Demarzo et al. 2008), o que não foi observado no presente estudo. Um estudo da década de 80 comparando os efeitos do DMH e do MNNG *in vitro* observou que o MNNG foi 3 vezes mais potente em inibir a replicação do DNA se comparado ao DMH, sugerindo que o MNNG produz uma alteração morfológica das criptas mais severa que o DMH (Telang & Williams 1982).

O maior dano estrutural causado pelo MNNG sobre a integridade da célula, se comparado ao DMH, pode justificar nosso resultado de não haver redução significativa do PCNA em resposta aos protocolos de exercício visto que esse carcinógeno sugere apresentar um menor efeito hiperproliferativo.

Em paralelo aos biomarcadores colônicos, investigamos o papel do exercício na modulação das citocinas pró e anti-inflamatórias neste tecido. A regulação das células inflamatórias sobre o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas são em parte dependentes da ação das citocinas que podem direta ou indiretamente controlar seu comportamento (Monteleone et al. 2012). Logo este balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adquire um papel determinante na iniciação e progressão da carcinogênese de cólon. A IL-10, especificamente, demonstrou um papel crucial na indução de uma resposta anti-inflamatória intestinal ao mesmo tempo que controlava o aumento de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Danese & Mantovani 2010). Além disso, animais *knock-out* para IL-10 favoreceram o desenvolvimento de tumores espontâneos de cólon (Sturlan et al. 2001) e reverteram os efeitos farmacológicos de inibidores seletivos da COX-2 sobre a formação FCAs (Hegazi et al. 2003). No presente estudo, observamos um aumento significativo de IL-10 no grupo AM, enquanto que outras citocinas como TNF- α , IL-12 e o IFN- γ não foram alteradas de maneira significativa pelos protocolos de exercício associado ao MNNG, figuras 12. Uma justificativa para essa ausência de modulação das citocinas pró-inflamatórias em nosso estudo pode ser devido ao padrão imunológico da espécie BALB/c cujos linfócitos apresentam uma resposta imune do tipo Th2 (Sypek et al. 1993; Mills et al. 2000). Esse padrão imune esteve correlacionado a uma baixa produção de TNF- α e IL-12, e por conseguinte IFN- γ , enquanto que a produção de IL-10 se manteve similar, comparado ao padrão imune do tipo Th1 em camundongos C57BL/6 (Watanabe et al. 2004). Estes autores observaram que camundongos BALB/c expostos a agentes agressores como bactérias não aumentaram a produção de TNF- α e IL-12 como mecanismo de defesa, o que pode justificar a menor adaptação dessas citocinas pela combinação da exposição ao MNNG associado aos protocolos de exercício de nosso estudo.

O exercício físico aeróbio pode modular a concentração plasmática e músculo esquelética desses clássicos marcadores pró (TNF- α) e anti-inflamatório (IL-10) em animais (Lira et al. 2009; Cleto et al. 2011; Packer & Hoffman-Goetz 2012), contudo pouco se sabe sobre os

efeitos do exercício sobre essas citocinas no tecido colônico. Hoffman-Goetz e cols. (2008) observaram que após três sessões de exercício aeróbio em esteira houve um aumento agudo de IL-10 intestinal que não se manteve 24 horas após, ao passo que os níveis de TNF- α caíram somente no período tardio de 24h. Em outro estudo, agora com exercício crônico (quatro meses), os autores demonstraram que tanto os níveis de IL-10 quanto de TNF- α e IL-1 β intestinais estiveram aumentados, comparados ao grupo sedentário (Packer & Hoffman-Goetz 2012). Nosso estudo acrescenta que o modelo aeróbio de exercício mantém os níveis de IL-10 elevados no intestino de forma crônica e demonstra que os modelos resistido e combinado não alteraram de maneira significativa os níveis de IL-10 quando expostos a um agente agressor, no caso o carcinógeno MNNG. Este efeito “anti-inflamatório” causado pelo aumento de IL-10 colônica no grupo AM sugere que este seja um mecanismo central na redução de FCAs pelo exercício aeróbio.

A indução química da carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que envolve direta ou indiretamente a geração de RL nesse processo neoplásico (Klaunig et al. 2011). Logo, a investigação sobre estresse oxidativo foi um fator considerado em nosso estudo. Nosso estudo resultou que o grupo combinado (CM) apresentou maior estresse oxidativo em virtude dos maiores níveis de AOPP muscular e hepático (figuras 5A e 8A). A relação desse marcador com a formação de FCAs no cólon ainda é incerta, contudo, elevados níveis plasmáticos de AOPP foi encontrado em indivíduos com câncer de cólon (Avinash et al. 2009). Um recente estudo destacou o papel do acúmulo de AOPP na geração de radicais livres e morte de células intestinais contribuindo para a progressão da doença inflamatória intestinal (Xie et al. 2014), contribuindo para a diminuição das células caliciformes, importante fator associado a formação de criptas displásicas (Paulsen et al. 2005). Nosso estudo não resultou em uma diferença significativa de AOPP no cólon dos grupos expostos ao carcinógeno (figura 9), no entanto, a maior concentração desse marcador em outros tecidos sugere que o grupo combinado esteve mais exposto ao ataque dos RL. Nossa hipótese é ainda suportada pela análise da resposta antioxidante sérica desse grupo estar menor visto que os níveis de CAT foram menores neste grupo. A diminuição dos níveis plasmáticos de CAT obteve uma relação inversa com o risco de câncer de cólon em um largo estudo populacional (La Vecchia et al. 2013) No entanto os grupos de protocolo combinado (C e CM) apresentaram uma maior concentração de GSH no soro. Embora aumentado os níveis de glutatona no soro, não podemos inferir que esse dado representa um melhor efeito antioxidante pelo fato de nossa técnica ter dosado a glutatona total (GSH + GSSG). Em condições normais a quantidade de GSH predomina

nas células em uma razão de até 100:1 enquanto que em vários modelos de estresse oxidativo, essa proporção diminui para valores de 10:1 (Chai et al. 1994). Além disso, em condições de exercício intenso, o fígado redistribui GSH para o soro e músculo esquelético (Karanth & Jeevaratnam 2005) na tentativa de conter o ataque de radicais livres para outros tecidos, limitando a interpretação desse resultado.

Os produtos de peroxidação lipídica no soro analisado pelo TBARS nos grupos AM e RM foram menores, enquanto que o grupo RM ainda apresentou uma menor formação de hidroperóxidos lipídicos no músculo esquelético, comparados ao grupo SM. Contudo, o grupo RM apresentou menores níveis de GSH e acompanhado de sua menor razão GSH/GSSG comparado ao sedentário SM (figuras 8C e D). A razão GSH/GSSG é um significativo parâmetro do estresse oxidativo celular (Valko et al. 2007), com uma diminuição de sua razão indicando maior susceptibilidade ao dano oxidativo (Nedeljkovic & Gokce 2005). Nosso estudo demonstrou que a interação entre o protocolo resistido e a indução do carcinógeno químico aumentou os níveis de GSSG hepático. Um estudo prévio observou que a razão GSH/GSSG estava diminuído no fígado de ratos submetidos ao protocolo de escalada (Rodrigues et al. 2013), indicando que as vias enzimáticas de conversão de GSSG no fígado estejam prejudicadas pelo protocolo resistido. No entanto, nossos dados demonstraram uma redução apenas no grupo resistido + MNNG o que implica em uma possível interação do carcinógeno nesse parâmetro. A redução da GSSG de volta a GSH é um processo catalisado pela GR que utiliza a NADPH como substrato redutor (figura 1) sendo que a NADPH é produzida pela glicose 6-fosfato via ciclo das pentoses no fígado (Ozer et al. 2002). Redução na via da glicose 6-fosfato esteve correlacionada com a carcinogênese de cólon quimicamente induzida e está redução esteve diretamente relacionado com a maior expressão de MT mutada (Jasani et al. 1998). Dessa forma, o aumento da MT colônica no grupo RM em nosso estudo (figura 11E) indica que a atividade da glicose 6-fosfato possa também estar prejudicada no fígado o que levou a uma menor ressíntese de NADPH e por fim colaborando com acúmulo de GSSG neste tecido. Contudo, a interação do carcinógeno MNNG com o metabolismo de outros tecidos permanece pouco elucidada e carece de maiores evidências. Nosso estudo destacou uma menor capacidade anti-oxidante da glutathiona pelo protocolo resistido + MNNG e uma maior taxa de formação de produtos de peroxidação no protocolo combinado + MNNG, ambos eventos associados ao estresse oxidativo, possa ter favorecido o efeito limitado desses protocolos no controle da formação de FCAs induzido pelo MNNG em nosso estudo.

Nosso estudo ainda objetivou investigar as adaptações do músculo esquelético em resposta aos diferentes protocolos de exercício. Observamos que houve um aumento progressivo das cargas em ambos os protocolos resistido e combinado sem nenhuma diferença considerando apenas a variável do carcinógeno sobre esse parâmetro (figuras 4A e 4B) enquanto que os grupos do protocolo resistido (R e RM) obtiveram maiores médias de cargas semanais nas semanas 6 e 8 (figuras 4C e 4D), o que indica que o parâmetro de frequência tenha sido um fator relevante na comparação entre as cargas de nossos grupos experimentais submetidos ao protocolo resistido. De fato, um estudo prévio em humanos considerou que a frequência de três vezes obteve maiores ganhos de pico de força se comparado ao mesmo protocolo realizado duas vezes na semana ao longo de 10 e 18 semanas (Braith et al. 1989).

Ainda que demonstrado um aumento progressivo de carga em ambos os protocolos, nosso estudo não observou um aumento significativo de hipertrofia do músculo gastrocnêmio, sugerindo que esse aumento de carga não tenha decorrido exclusivamente de adaptações estruturais da fibra muscular. Em protocolos prévios que utilizaram a escalada como modelo de exercício resistido, os autores observaram um aumento significativo de hipertrofia do gastrocnêmio apenas com 16 semanas (Matheny et al. 2009), enquanto outros, com tempo de treinamento similar ao nosso (8 semanas) não encontraram diferença (Lee & Farrar 2003). Além disso, o padrão de contração muscular na escalada demonstrou que os animais realizam uma contração com predomínio concêntrica dos flexores plantares (sóleo, plantar e gastrocnêmio) (Lee & Farrar 2003). Sabe-se entretanto que a contração excêntrica é mais eficaz em promover ganhos de síntese proteica e hipertrofia (Ochi et al. 2010). Logo, essa dinâmica de contração e característica anatômica dos músculos favorecia a hipertrofia de alguns como o flexor longo do hálux e o plantar como alvos da resposta hipertrofica nesse modelo (Matheny et al. 2009). Neste sentido, é possível especularmos que o aumento progressivo de carga em nosso modelo tenha desencadeado adaptações neurais mais significativas que mudanças tróficas, provavelmente pelo melhor padrão de ativação das unidades motoras (Sale 1988) e devido ao curto tempo de exercício (Selvanayagam et al. 2011).

A investigação sobre as adaptações enzimáticas no músculo sóleo em respostas aos diferentes protocolos de exercício demonstraram que todos os protocolos estimularam de maneira significativa a expressão da catalase em comparação ao grupo controle, sem diferença

aparente diferença entre os protocolos (figura 6A), sugerindo que esta seja uma importante adaptação ao mecanismo antioxidante muscular na redução dos RLs como o peróxido de hidrogênio. No entanto, a atividade da CS foi significativamente maior apenas no grupo CM ($p < 0,05$) com um aumento da atividade de 31% no grupo C, comparado ao sedentário (S), mas não significativo. A vantagem do protocolo combinado em aumentar a atividade da CS no músculo sugere que este protocolo atingiu uma intensidade e duração mais eficaz para estimular essa enzima, corroborando com os dados de Powers e cols. (1994) que observaram que a intensidade e a duração do exercício estão diretamente correlacionados a maior atividade da CS.

7. CONCLUSÃO

Por fim, nosso estudo destacou que os efeitos do exercício sobre a redução dos FCAs e sua multiplicidade foi modalidade-dependente. De fato, somente o grupo AM apresentou uma menor formação de FCAs acompanhado de uma menor marcação de MT no cólon. Em paralelo, este protocolo desencadeou uma maior concentração IL-10 no cólon o que sugere um possível mecanismo de modulação anti-inflamatória pelo exercício aeróbio sobre o controle da formação de lesões pré-neoplásicas no cólon.

Contrário a nossa hipótese inicial, as modalidades de exercício resistido e combinado não alteraram a formação de FCAs. A justificativa para esse resultado pode estar relacionada ao maior estresse oxidativo em resposta a esses protocolos uma vez que observamos uma maior concentração de AOPP hepática e muscular no grupo CM e uma menor razão GSH/GSSG no grupo RM. Contudo, nossos protocolos foram efetivos em estimular a expressão da catalase ao passo que o protocolo combinado aumentou a quantidade de CS solear.

8.REFERÊNCIAS

1. al-Majid, S. and McCarthy, D.O. Resistance exercise training attenuates wasting of the extensor digitorum longus muscle in mice bearing the colon-26 adenocarcinoma. *Biol Res Nurs*, v. 2, p. 155-66. 2001.
2. Al-Majid, S. and Waters, H. The biological mechanisms of cancer-related skeletal muscle wasting: the role of progressive resistance exercise. *Biol Res Nurs*, v. 10, p. 7-20. 2008.
3. Alderman, C.J., Shah, S., Foreman, J.C., Chain, B.M., andKatz, D.R. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med*, v. 32, p. 377-85. 2002.
4. Ames, B.N. and Gold, L.S. Animal cancer tests and cancer prevention. *J Natl Cancer Inst Monogr*, v., p. 125-32. 1992.
5. Anderstam, B., Ann-Christin, B.H., Valli, A., Stenvinkel, P., Lindholm, B., andSuliman, M.E. Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: application in uremic samples. *Clin Chim Acta*, v. 393, p. 114-8. 2008.
6. Aoi, W., Naito, Y., Takagi, T., Kokura, S., Mizushima, K., Takanami, Y., Kawai, Y., Tanimura, Y., Hung, L.P., Koyama, R., Ichikawa, H., andYoshikawa, T. Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 399, p. 14-9. 2010.
7. Attaix, D., Ventadour, S., Codran, A., Bechet, D., Taillandier, D., andCombaret, L. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem*, v. 41, p. 173-86. 2005.
8. Avinash, S.S., Anitha, M., Vinodchandran, Rao, G.M., Sudha, K., andShetty, B.V. Advanced oxidation protein products and total antioxidant activity in colorectal carcinoma. *Indian J Physiol Pharmacol*, v. 53, p. 370-4. 2009.
9. Balmain, A. and Harris, C.C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, v. 21, p. 371-7. 2000.
10. Bara, J., Fogue-Lafitte, M.E., Maurin, N., Flejou, J.F., andZimber, A. Abnormal expression of gastric mucin in human and rat aberrant crypt foci during colon carcinogenesis. *Tumour Biol*, v. 24, p. 109-15. 2003.

11. Bardelli, A., Cahill, D.P., Lederer, G., Speicher, M.R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. Carcinogen-specific induction of genetic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 5770-5. 2001.
12. Bazensky, I., Shoobridge-Moran, C., and Yoder, L.H. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. *Medsurg Nurs*, v. 16, p. 46-51; quiz 52. 2007.
13. Bigley, A.B., Spielmann, G., LaVoy, E.C., and Simpson, R.J. Can exercise-related improvements in immunity influence cancer prevention and prognosis in the elderly? *Maturitas*, v. 76, p. 51-6. 2013.
14. Bird, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*, v. 37, p. 147-51. 1987.
15. Bird, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett*, v. 93, p. 55-71. 1995.
16. Bird, R.P. and Good, C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett*, v. 112-113, p. 395-402. 2000.
17. Bousserouel, S., Lamy, V., Gosse, F., Lobstein, A., Marescaux, J., and Raul, F. Early modulation of gene expression used as a biomarker for chemoprevention in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Pathol Int*, v. 61, p. 80-7. 2011.
18. Boyle, P. and Langman, J.S. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, v. 321, p. 805-8. 2000.
19. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54. 1976.
20. Braith, R.W., Graves, J.E., Pollock, M.L., Leggett, S.L., Carpenter, D.M., and Colvin, A.B. Comparison of 2 vs 3 days/week of variable resistance training during 10- and 18-week programs. *Int J Sports Med*, v. 10, p. 450-4. 1989.
21. Brown, J.C., Troxel, A.B., and Schmitz, K.H. Safety of weightlifting among women with or at risk for breast cancer-related lymphedema: musculoskeletal injuries and health care use in a weightlifting rehabilitation trial. *Oncologist*, v. 17, p. 1120-8. 2012.
22. Bruewer, M., Schmid, K.W., Krieglstein, C.F., Senninger, N., and Schuermann, G. Metallothionein: early marker in the carcinogenesis of ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma. *World J Surg*, v. 26, p. 726-31. 2002.

23. Buffart, L.M., Galvao, D.A., Chinapaw, M.J., Brug, J., Taaffe, D.R., Spry, N., Joseph, D., and Newton, R.U. Mediators of the resistance and aerobic exercise intervention effect on physical and general health in men undergoing androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Cancer*, v. 120, p. 294-301. 2014.
24. Burneiko, R.C., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Rodrigues, H.G., Ebaid, G.M., Faine, L.A., Padovani, C.R., Cicogna, A.C., and Novelli, E.L. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol*, v. 44, p. 1167-72. 2006.
25. Campbell, K.L., McTiernan, A., Li, S.S., Sorensen, B.E., Yasui, Y., Lampe, J.W., King, I.B., Ulrich, C.M., Rudolph, R.E., Irwin, M.L., Surawicz, C., Ayub, K., Potter, J.D., and Lampe, P.D. Effect of a 12-month exercise intervention on the apoptotic regulating proteins Bax and Bcl-2 in colon crypts: a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 16, p. 1767-74. 2007.
26. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, v. 17, p. 1395-413. 1998.
27. Carroll, A.M., Palmer, A.A., and Lionikas, A. QTL Analysis of Type I and Type IIA Fibers in Soleus Muscle in a Cross between LG/J and SM/J Mouse Strains. *Front Genet*, v. 2, p. 99. 2011.
28. Caspersen, C.J., Powell, K.E., and Christenson, G.M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*, v. 100, p. 126-31. 1985.
29. Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, R.B., Jr., and Thomas, J.A. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*, v. 310, p. 273-81. 1994.
30. Che, T.C., Francois, S., Bouchet, S., Chapel, A., and Forgue-Lafitte, M.E. Early lesions induced in rat colon epithelium by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Tissue Cell*, v. 42, p. 190-4. 2010.
31. Chiu, L.Y., Ho, F.M., Shiah, S.G., Chang, Y., and Lin, W.W. Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly(ADP-ribose)polymerase-1-dependent parthanatos cell death. *Biochem Pharmacol*, v. 81, p. 459-70. 2011.
32. Cleto, L.S., Oletto, A.F., Sousa, L.P., Barreto, T.O., Cruz, J.S., Penaforte, C.L., Magalhaes, J.C., Sousa-Franco, J., Pinto, K.M., Campi-Azevedo, A.C., and Rocha-Vieira, E. Plasma cytokine

response, lipid peroxidation and NF- κ B activation in skeletal muscle following maximum progressive swimming. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, p. 546-52. 2011.

33. Coffey, V.G., Jemiolo, B., Edge, J., Garnham, A.P., Trappe, S.W., and Hawley, J.A. Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 297, p. R1441-51. 2009.

34. Corpet, D.E. and Tache, S. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer*, v. 43, p. 1-21. 2002.

35. Costa, C.M., Santos, R.C.C., and Lima, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, p. 345-350. 2006.

36. Danese, S. and Mantovani, A. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene*, v. 29, p. 3313-23. 2010.

37. De Backer, I.C., Schep, G., Backx, F.J., Vreugdenhil, G., and Kuipers, H. Resistance training in cancer survivors: a systematic review. *Int J Sports Med*, v. 30, p. 703-12. 2009.

38. Demarzo, M.M. and Garcia, S.B. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer Lett*, v. 216, p. 31-4. 2004.

39. Demarzo, M.M., Martins, L.V., Fernandes, C.R., Herrero, F.A., Perez, S.E., Turatti, A., and Garcia, S.B. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. *Med Sci Sports Exerc*, v. 40, p. 618-21. 2008.

40. Djordjevic, V.B. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol*, v. 237, p. 57-89. 2004.

41. Donatto, F.F., Neves, R.X., Rosa, F.O., Camargo, R.G., Ribeiro, H., Matos-Neto, E.M., and Seelaender, M. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine*, v. 61, p. 426-32. 2013.

42. Donnelly, E.T., Bardwell, H., Thomas, G.A., Williams, E.D., Hoper, M., Crowe, P., McCluggage, W.G., Stevenson, M., Phillips, D.H., Hewer, A., Osborne, M.R., and Campbell, F.C. Modulation of N-methyl-N-nitrosourea-induced crypt restricted metallothionein immunopositivity in mouse colon by a non-genotoxic diet-related chemical. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 847-55. 2004.

43. Donnelly, E.T., Bardwell, H., Thomas, G.A., Williams, E.D., Hoper, M., Crowe, P., McCluggage, W.G., Stevenson, M., Phillips, D.H., Hewer, A., Osborne, M.R., and Campbell, F.C.

Metallothionein crypt-restricted immunopositivity indices (MTCRII) correlate with aberrant crypt foci (ACF) in mouse colon. *Br J Cancer*, v. 92, p. 2160-5. 2005.

44. Donnelly, J.E., Blair, S.N., Jakicic, J.M., Manore, M.M., Rankin, J.W., Smith, B.K., and American College of Sports, M. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc*, v. 41, p. 459-71. 2009.

45. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, v. 82, p. 47-95. 2002.

46. Dziegiel, P., Forgacz, J., Suder, E., Surowiak, P., Kornafel, J., and Zabel, M. Prognostic significance of metallothionein expression in correlation with Ki-67 expression in adenocarcinomas of large intestine. *Histol Histopathol*, v. 18, p. 401-7. 2003.

47. Eaden, J.A., Abrams, K.R., and Mayberry, J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, v. 48, p. 526-35. 2001.

48. El Assar, M., Angulo, J., and Rodriguez-Manas, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med*, v. 65, p. 380-401. 2013.

49. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, v. 37, p. 277-85. 2004a.

50. Erel, O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, v. 37, p. 112-9. 2004b.

51. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, v. 61, p. 759-67. 1990.

52. Ferketich, A.K., Kirby, T.E., and Alway, S.E. Cardiovascular and muscular adaptations to combined endurance and strength training in elderly women. *Acta Physiol Scand*, v. 164, p. 259-67. 1998.

53. Finaud, J., Lac, G., and Filaire, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, v. 36, p. 327-58. 2006.

54. Friedenreich, C.M., Neilson, H.K., and Lynch, B.M. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer*, v. 46, p. 2593-604. 2010.

55. Galvao, D.A., Taaffe, D.R., Spry, N., Joseph, D., and Newton, R.U. Combined resistance and aerobic exercise program reverses muscle loss in men undergoing androgen suppression therapy

for prostate cancer without bone metastases: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*, v. 28, p. 340-7. 2010.

56. Garber, C.E., Blissmer, B., Deschenes, M.R., Franklin, B.A., Lamonte, M.J., Lee, I.M., Nieman, D.C., and Swain, D.P. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 43, p. 1334-59. 2011.

57. Garcia, S.B., Barros, L.T., Turatti, A., Martinello, F., Modiano, P., Ribeiro-Silva, A., Vespuccio, M.V., and Uyemura, S.A. The anti-obesity agent Orlistat is associated to increase in colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer Lett*, v. 240, p. 221-4. 2006.

58. Garrel, C., Fowler, P.A., and Al-Gubory, K.H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J Endocrinol*, v. 205, p. 107-16. 2010.

59. Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., and Chaudiere, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*, v. 11, p. 1176-83. 1998.

60. Gupta, A.K., Pretlow, T.P., and Schoen, R.E. Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. *Clin Gastroenterol Hepatol*, v. 5, p. 526-33. 2007.

61. Haerslev, T., Jacobsen, K., Nedergaard, L., and Zedeler, K. Immunohistochemical detection of metallothionein in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases. *Pathol Res Pract*, v. 190, p. 675-81. 1994.

62. Hagggar, F.A. and Boushey, R.P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, v. 22, p. 191-7. 2009.

63. Hamiza, O.O., Rehman, M.U., Khan, R., Tahir, M., Khan, A.Q., Lateef, A., and Sultana, S. Chemopreventive effects of aloin against 1,2-dimethylhydrazine-induced preneoplastic lesions in the colon of Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*, v. 33, p. 148-63. 2014.

64. Hegazi, R.A., Mady, H.H., Melhem, M.F., Sepulveda, A.R., Mohi, M., and Kandil, H.M. Celecoxib and rofecoxib potentiate chronic colitis and premalignant changes in interleukin 10 knockout mice. *Inflamm Bowel Dis*, v. 9, p. 230-6. 2003.

65. Herrero, F., San Juan, A.F., Fleck, S.J., Balmer, J., Perez, M., Canete, S., Earnest, C.P., Foster, C., and Lucia, A. Combined aerobic and resistance training in breast cancer survivors: A randomized, controlled pilot trial. *Int J Sports Med*, v. 27, p. 573-80. 2006.
66. Hickson, R.C. Interference of strength development by simultaneously training for strength and endurance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v. 45, p. 255-63. 1980.
67. Hishikawa, Y., Kohno, H., Ueda, S., Kimoto, T., Dhar, D.K., Kubota, H., Tachibana, M., Koji, T., and Nagasue, N. Expression of metallothionein in colorectal cancers and synchronous liver metastases. *Oncology*, v. 61, p. 162-7. 2001.
68. Hoffman-Goetz, L., Spagnuolo, P.A., and Guan, J. Repeated exercise in mice alters expression of IL-10 and TNF-alpha in intestinal lymphocytes. *Brain Behav Immun*, v. 22, p. 195-9. 2008.
69. Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C., and Lillig, C.H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans*, v. 33, p. 1375-7. 2005.
70. Hornberger, T.A., Jr. and Farrar, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*, v. 29, p. 16-31. 2004.
71. Howley, E.T. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, p. S364-9; discussion S419-20. 2001.
72. Ioachim, E.E., Goussia, A.C., Agnantis, N.J., Machera, M., Tsianos, E.V., and Kappas, A.M. Prognostic evaluation of metallothionein expression in human colorectal neoplasms. *J Clin Pathol*, v. 52, p. 876-9. 1999.
73. Ivanova, D.G. and Yankova, T.M. The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span. *Folia Med (Plovdiv)*, v. 55, p. 33-41. 2013.
74. Izumi, K., Otsuka, H., Furuya, K., and Akagi, A. Carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in BALB/c mice. Influence of the route of administration and dosage. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, v. 384, p. 263-7. 1979.
75. Izutani, R., Loh, E.Y., Reinecker, H.C., Ohno, Y., Fusunyan, R.D., Lichtenstein, G.R., Rombeau, J.L., and Macdermott, R.P. Increased expression of interleukin-8 mRNA in ulcerative colitis and Crohn's disease mucosa and epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*, v. 1, p. 37-47. 1995.
76. Jackson, P.E., O'Connor, P.J., Cooper, D.P., Margison, G.P., and Povey, A.C. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, v. 24, p. 527-33. 2003.

77. Jarry, A., Bossard, C., Bou-Hanna, C., Masson, D., Espaze, E., Denis, M.G., and Laboisse, C.L. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest*, v. 118, p. 1132-42. 2008.
78. Jasani, B., Campbell, F., Navabi, H., Schmid, K.W., and Williams, G.T. Clonal overexpression of metallothionein is induced by somatic mutation in morphologically normal colonic mucosa. *J Pathol*, v. 184, p. 144-7. 1998.
79. Jemal, A., Thun, M.J., Ries, L.A., Howe, H.L., Weir, H.K., Center, M.M., Ward, E., Wu, X.C., Ehemann, C., Anderson, R., Ajani, U.A., Kohler, B., and Edwards, B.K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*, v. 100, p. 1672-94. 2008.
80. Ji, L.L., Leeuwenburgh, C., Leichtweis, S., Gore, M., Fiebig, R., Hollander, J., and Bejma, J. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann N Y Acad Sci*, v. 854, p. 102-17. 1998.
81. Jones, D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, v. 8, p. 1865-79. 2006.
82. Ju, J., Nolan, B., Cheh, M., Bose, M., Lin, Y., Wagner, G.C., and Yang, C.S. Voluntary exercise inhibits intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice and azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. *BMC Cancer*, v. 8, p. 316. 2008.
83. Kannen, V., Hintzsche, H., Zanette, D.L., Silva, W.A., Jr., Garcia, S.B., Waaga-Gasser, A.M., and Stopper, H. Antiproliferative effects of fluoxetine on colon cancer cells and in a colonic carcinogen mouse model. *PLoS One*, v. 7, p. e50043. 2012.
84. Kannen, V., Marini, T., Zanette, D.L., Frajacom, F.T., Silva, G.E., Silva, W.A., Jr., and Garcia, S.B. The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 405, p. 593-8. 2011.
85. Karanth, J. and Jeevaratnam, K. Oxidative stress and antioxidant status in rat blood, liver and muscle: effect of dietary lipid, carnitine and exercise. *Int J Vitam Nutr Res*, v. 75, p. 333-9. 2005.
86. Karavirta, L., Hakkinen, K., Kauhanen, A., Arijia-Blazquez, A., Sillanpaa, E., Rinkinen, N., and Hakkinen, A. Individual responses to combined endurance and strength training in older adults. *Med Sci Sports Exerc*, v. 43, p. 484-90. 2011.
87. Khansari, N., Shakiba, Y., and Mahmoudi, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, v. 3, p. 73-80. 2009.

88. Kim, H.J., Lee, A.K., Kim, Y.G., Bu, S.C., Kim, S.H., Yang, C.H., Suh, O.K., Kim, S.G., and Lee, M.G. Influence of 4-week and 8-week exercise training on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral azosemide in rats. *Life Sci*, v. 70, p. 2299-319. 2002.
89. Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 44, p. 239-67. 2004.
90. Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Hocevar, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, v. 38, p. 96-109. 2010.
91. Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 254, p. 86-99. 2011.
92. Klitgaard, H., Zhou, M., and Richter, E.A. Myosin heavy chain composition of single fibres from m. biceps brachii of male body builders. *Acta Physiol Scand*, v. 140, p. 175-80. 1990.
93. Kressner, U., Bjorheim, J., Westring, S., Wahlberg, S.S., Pahlman, L., Glimelius, B., Lindmark, G., Lindblom, A., and Borresen-Dale, A.L. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, v. 34, p. 518-21. 1998.
94. Kushi, L.H., Byers, T., Doyle, C., Bandera, E.V., McCullough, M., McTiernan, A., Gansler, T., Andrews, K.S., Thun, M.J., American Cancer Society, N., and Physical Activity Guidelines Advisory, C. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin*, v. 56, p. 254-81; quiz 313-4. 2006.
95. Kushi, L.H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C.L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E.V., Gapstur, S., Patel, A.V., Andrews, K., and Gansler, T. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin*, v. 62, p. 30-67. 2012.
96. La Vecchia, C., Decarli, A., Serafini, M., Parpinel, M., Bellocco, R., Galeone, C., Bosetti, C., Zucchetto, A., Polesel, J., Lagiou, P., Negri, E., and Rossi, M. Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer: a large case-control study in Italy. *Int J Cancer*, v. 133, p. 1447-51. 2013.
97. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-5. 1970.
98. Lang, C.A., Mills, B.J., Mastropaolo, W., and Liu, M.C. Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med*, v. 135, p. 402-5. 2000.

99. Lee, S. and Farrar, R.P. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. *Journal of Exercise Physiology-online*, v. 6, p. 80-87. 2003.
100. Lira, F.S., Koyama, C.H., Yamashita, A.S., Rosa, J.C., Zanchi, N.E., Batista, M.L., Jr., and Seelaender, M.C. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell Biochem Funct*, v. 27, p. 458-61. 2009.
101. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, p. 265-75. 1951.
102. Lu, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, v. 13, p. 1169-83. 1999.
103. Lundberg, T.R., Fernandez-Gonzalo, R., Gustafsson, T., and Tesch, P.A. Aerobic exercise alters skeletal muscle molecular responses to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 44, p. 1680-8. 2012.
104. Lundberg, T.R., Fernandez-Gonzalo, R., Gustafsson, T., and Tesch, P.A. Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. *J Appl Physiol*, v. 114, p. 81-9. 2013.
105. Lunz, W., Peluzio, M.C., Dias, C.M., Moreira, A.P., and Natali, A.J. Long-term aerobic swimming training by rats reduces the number of aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Braz J Med Biol Res*, v. 41, p. 1000-4. 2008.
106. MacDermott, R.P. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, v. 31, p. 907-16. 1996.
107. Madara, J.L., Harte, P., Deasy, J., Ross, D., Lahey, S., and Steele, G., Jr. Evidence for an adenoma-carcinoma sequence in dimethylhydrazine-induced neoplasms of rat intestinal epithelium. *Am J Pathol*, v. 110, p. 230-5. 1983.
108. Martin, M.S., Martin, F., Michiels, R., Bastien, H., Justrabo, E., Bordes, M., and Viry, B. An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat 1,2-dimethylhydrazine. *Digestion*, v. 8, p. 22-34. 1973.
109. Martinez, M.E. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res*, v. 166, p. 177-211. 2005.
110. Mates, J.M., Perez-Gomez, C., and Nunez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, v. 32, p. 595-603. 1999.

111. Matheny, R.W., Merritt, E., Zannikos, S.V., Farrar, R.P., and Adamo, M.L. Serum IGF-I deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 234, p. 164-70. 2009.
112. Maurin, N., Forgue-Lafitte, M.E., Levy, P., Zimmer, A., and Bara, J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis. *Int J Cancer*, v. 120, p. 477-83. 2007.
113. McCarthy, J.P., Pozniak, M.A., and Agre, J.C. Neuromuscular adaptations to concurrent strength and endurance training. *Med Sci Sports Exerc*, v. 34, p. 511-9. 2002.
114. Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, v. 164, p. 6166-73. 2000.
115. Milne, H.M., Wallman, K.E., Gordon, S., and Courneya, K.S. Effects of a combined aerobic and resistance exercise program in breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Breast Cancer Res Treat*, v. 108, p. 279-88. 2008.
116. Monteleone, G., Pallone, F., and Stolfi, C. The dual role of inflammation in colon carcinogenesis. *Int J Mol Sci*, v. 13, p. 11071-84. 2012.
117. Mori, F., Della Rocca, C., and Lazzaro, D. Metallothionein colon crypt immuno-positivity as a rapid in vivo assay for drug efficacy studies. *In Vivo*, v. 26, p. 693-702. 2012.
118. Mori, H., Hata, K., Yamada, Y., Kuno, T., and Hara, A. Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact*, v. 155, p. 1-9. 2005.
119. Na, H.K. and Oliynyk, S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1229, p. 176-83. 2011.
120. Nagel, W.W. and Vallee, B.L. Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 579-83. 1995.
121. Nakatani, K., Komatsu, M., Kato, T., Yamanaka, T., Takekura, H., Wagatsuma, A., Aoyama, K., Xu, B., Hirano, T., Kasai, H., Ando, S., and Takeuchi, T. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*, v. 39, p. 905-11. 2005.
122. Nambiar, P.R., Girnun, G., Lillo, N.A., Guda, K., Whiteley, H.E., and Rosenberg, D.W. Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *Int J Oncol*, v. 22, p. 145-50. 2003.

123. Nascimento, C.C., Padula, N., Milani, J.G., Shimano, A.C., Martinez, E.Z., and Mattiello-Sverzut, A.C. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle to swimming, immobilization and rehabilitation. *Braz J Med Biol Res*, v. 41, p. 818-24. 2008.
124. Nedeljkovic, Z.S. and Gokce, N. Oxidative stress and exercise. *J Cardiopulm Rehabil*, v. 25, p. 220-1. 2005.
125. Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc*, v. 2, p. 1998-2004. 2007.
126. Newton, R.U. and Galvao, D.A. Exercise in prevention and management of cancer. *Curr Treat Options Oncol*, v. 9, p. 135-46. 2008.
127. Norlida, A.O. and Phang, K.S. Histomorphology of aberrant crypt foci in colorectal carcinoma. *Malays J Pathol*, v. 32, p. 111-6. 2010.
128. Ochi, E., Hirose, T., Hiranuma, K., Min, S.K., Ishii, N., and Nakazato, K. Elevation of myostatin and FOXOs in prolonged muscular impairment induced by eccentric contractions in rat medial gastrocnemius muscle. *J Appl Physiol (1985)*, v. 108, p. 306-13. 2010.
129. Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., and Hirose, M. Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment. *Cancer Lett*, v. 198, p. 145-52. 2003.
130. Owen, J.B. and Butterfield, D.A. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods Mol Biol*, v. 648, p. 269-77. 2010.
131. Ozer, N., Bilgi, C., and Hamdi Ogus, I. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 34, p. 253-62. 2002.
132. Packer, N. and Hoffman-Goetz, L. Training preserves the intestinal cytokine response to acute exercise in older mice. *Med Sci Sports Exerc*, v. 44, p. 591-9. 2012.
133. Paulsen, J.E., Knutsen, H., Olstorn, H.B., Loberg, E.M., and Alexander, J. Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated A/J mice. *Int J Cancer*, v. 118, p. 540-6. 2006.
134. Paulsen, J.E., Loberg, E.M., Olstorn, H.B., Knutsen, H., Steffensen, I.L., and Alexander, J. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. *Cancer Res*, v. 65, p. 121-9. 2005.

135. Petersen, A.M. and Pedersen, B.K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol*, v. 57 Suppl 10, p. 43-51. 2006.
136. Pinho, R.A., Andrades, M.E., Oliveira, M.R., Pirola, A.C., Zago, M.S., Silveira, P.C., Dal-Pizzol, F., and Moreira, J.C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*, v. 30, p. 848-53. 2006.
137. Pitot, H.C., Goldsworthy, T., and Moran, S. The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J Supramol Struct Cell Biochem*, v. 17, p. 133-46. 1981.
138. Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., and Dudley, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, v. 266, p. R375-80. 1994.
139. Pretolani, M. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. *Clin Exp Allergy*, v. 29, p. 1164-71. 1999.
140. Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., Nyakas, C., and Goto, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, v. 27, p. 69-74. 1999.
141. Radak, Z., Naito, H., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Cardozo-Pelaez, F., and Goto, S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, v. 445, p. 273-8. 2002.
142. Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, v. 1, p. 3159-65. 2006.
143. Reddy, B.S., Narisawa, T., Maronpot, R., Weisburger, J.H., and Wynder, E.L. Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel. *Cancer Res*, v. 35, p. 3421-6. 1975.
144. Reid, M.B. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* (1985), v. 90, p. 724-31. 2001.
145. Riggins, J.N. and Marnett, L.J. Mutagenicity of the malondialdehyde oligomerization products 2-(3'-oxo-1'-propenyl)-malondialdehyde and 2,4-dihydroxymethylene-3-(2,2-dimethoxyethyl)glutaraldehyde in *Salmonella*. *Mutat Res*, v. 497, p. 153-7. 2001.

146. Rodrigues, M.F., Stotzer, U.S., Domingos, M.M., Deminice, R., Shiguemoto, G.E., Tomaz, L.M., de Sousa, N.M., Ferreira, F.C., Leite, R.D., Selistre-de-Araujo, H.S., Jordao-Junior, A.A., Baldissera, V., andPerez, S.E. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 68, p. 1247-54. 2013.
147. Rogers, C.J., Colbert, L.H., Greiner, J.W., Perkins, S.N., andHursting, S.D. Physical activity and cancer prevention : pathways and targets for intervention. *Sports Med*, v. 38, p. 271-96. 2008.
148. Rosenberg, D.W., Giardina, C., andTanaka, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 30, p. 183-96. 2009.
149. Roy, R.R., Wilson, R., andEdgerton, V.R. Architectural and mechanical properties of the rat adductor longus: response to weight-lifting training. *Anat Rec*, v. 247, p. 170-8. 1997.
150. Sale, D.G. Neural adaptation to resistance training. *Med Sci Sports Exerc*, v. 20, p. S135-45. 1988.
151. Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, v. 30, p. 1191-212. 2001.
152. Scheffer, D.L., Silva, L.A., Tromm, C.B., da Rosa, G.L., Silveira, P.C., de Souza, C.T., Latini, A., andPinho, R.A. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 37, p. 1239-46. 2012.
153. Schmitz, K.H., Courneya, K.S., Matthews, C., Demark-Wahnefried, W., Galvao, D.A., Pinto, B.M., Irwin, M.L., Wolin, K.Y., Segal, R.J., Lucia, A., Schneider, C.M., von Gruenigen, V.E., andSchwartz, A.L. American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors. *Med Sci Sports Exerc*, v. 42, p. 1409-26. 2010.
154. Selvanayagam, V.S., Riek, S., andCarroll, T.J. Early neural responses to strength training. *J Appl Physiol (1985)*, v. 111, p. 367-75. 2011.
155. Shpitz, B., Bomstein, Y., Mekori, Y., Cohen, R., Kaufman, Z., Grankin, M., andBernheim, J. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am J Surg*, v. 174, p. 425-30. 1997.
156. Sies, H. and Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 311, p. 617-31. 1985.

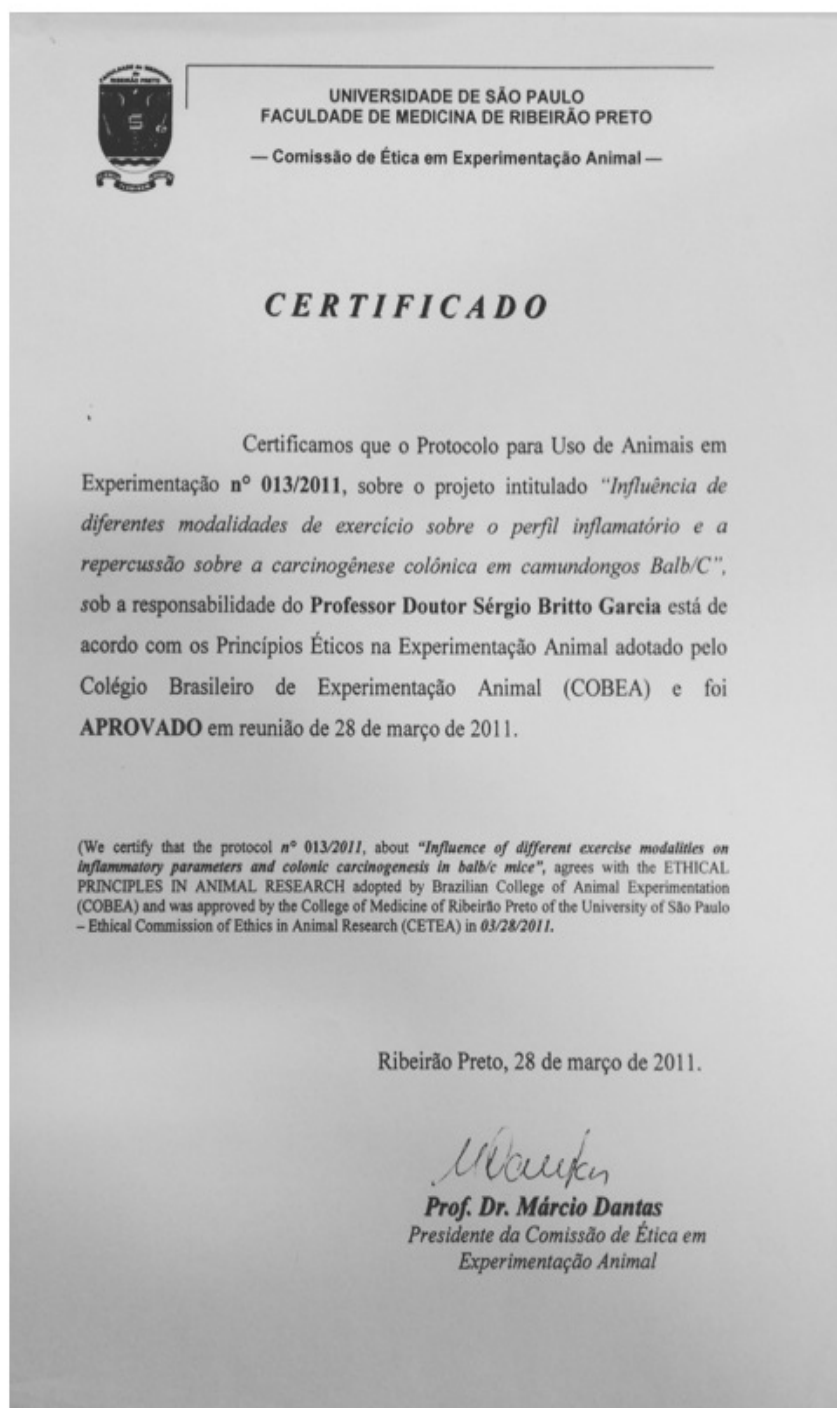
157. Silva, M.F., Sivieri, K., and Rossi, E.A. Effects of a probiotic soy product and physical exercise on formation of pre-neoplastic lesions in rat colons in a short-term model of carcinogenic. *J Int Soc Sports Nutr*, v. 6, p. 17. 2009.
158. Sipos, F., Valcz, G., and Molnar, B. Physiological and pathological role of local and immigrating colonic stem cells. *World J Gastroenterol*, v. 18, p. 295-301. 2012.
159. Skvarilova, M., Bulava, A., Stejskal, D., Adamovska, S., and Bartek, J. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v. 149, p. 83-7. 2005.
160. Slattery, M.L. Physical activity and colorectal cancer. *Sports Med*, v. 34, p. 239-52. 2004.
161. Speck, R.M., Courneya, K.S., Masse, L.C., Duval, S., and Schmitz, K.H. An update of controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Surviv*, v. 4, p. 87-100. 2010.
162. Speed-Andrews, A.E., McGowan, E.L., Rhodes, R.E., Blanchard, C.M., Culos-Reed, S.N., Friedenreich, C.M., and Courneya, K.S. Correlates of strength exercise in colorectal cancer survivors. *Am J Health Behav*, v. 37, p. 162-70. 2013.
163. Spirlandeli, A.L., Deminice, R., and Jordao, A.A. Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. *Int J Sports Med*, v. 35, p. 14-8. 2014.
164. Srere, P.A. Citryl-Coa. An Substrate for the Citrate-Cleavage Enzyme. *Biochim Biophys Acta*, v. 73, p. 523-5. 1963.
165. Starkie, R., Ostrowski, S.R., Jauffred, S., Febbraio, M., and Pedersen, B.K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB J*, v. 17, p. 884-6. 2003.
166. Sturlan, S., Oberhuber, G., Beinhauer, B.G., Tichy, B., Kappel, S., Wang, J., and Rogy, M.A. Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development. *Carcinogenesis*, v. 22, p. 665-71. 2001.
167. Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H., and Tanaka, T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, v. 27, p. 162-9. 2006.

168. Swenberg, J.A., Cooper, H.K., Bucheler, J., and Kleihues, P. 1,2-Dimethylhydrazine-induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram. *Cancer Res*, v. 39, p. 465-7. 1979.
169. Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., and Schaub, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med*, v. 177, p. 1797-802. 1993.
170. Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H., and Niitsu, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*, v. 339, p. 1277-84. 1998.
171. Tamaki, T., Uchiyama, S., and Nakano, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc*, v. 24, p. 881-6. 1992.
172. Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, v. 94, p. 965-73. 2003.
173. Telang, N.T. and Williams, G.M. Carcinogen-induced DNA damage and cellular alterations in F344 rat colon organ cultures. *J Natl Cancer Inst*, v. 68, p. 1015-22. 1982.
174. Timson, B.F., Bowlin, B.K., Dudenhoefter, G.A., and George, J.B. Fiber number, area, and composition of mouse soleus muscle following enlargement. *J Appl Physiol*, v. 58, p. 619-24. 1985.
175. Tisdale, M.J. Pathogenesis of cancer cachexia. *J Support Oncol*, v. 1, p. 159-68. 2003.
176. Trojian, T.H., Mody, K., and Chain, P. Exercise and colon cancer: primary and secondary prevention. *Curr Sports Med Rep*, v. 6, p. 120-4. 2007.
177. Turusov, V.S., Lanko, N.S., Krutovskikh, V.A., and Parfenov, Y.D. Strain differences in susceptibility of female mice to 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, v. 3, p. 603-8. 1982.
178. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, p. 44-84. 2007.
179. Valli, A., Suliman, M.E., Meert, N., Vanholder, R., Lindholm, B., Stenvinkel, P., Watanabe, M., Barany, P., Alvestrand, A., and Anderstam, B. Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors. *Clin Chim Acta*, v. 379, p. 87-94. 2007.

180. Venditti, P. and Di Meo, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys*, v. 331, p. 63-8. 1996.
181. Volaklis, K.A., Halle, M., and Tokmakidis, S.P. Exercise in the prevention and rehabilitation of breast cancer. *Wien Klin Wochenschr*, v. 125, p. 297-301. 2013.
182. Wali, R.K., Khare, S., Tretiakova, M., Cohen, G., Nguyen, L., Hart, J., Wang, J., Wen, M., Ramaswamy, A., Joseph, L., Sitrin, M., Brasitus, T., and Bissonnette, M. Ursodeoxycholic acid and F(6)-D(3) inhibit aberrant crypt proliferation in the rat azoxymethane model of colon cancer: roles of cyclin D1 and E-cadherin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 11, p. 1653-62. 2002.
183. Ward, J.M. Morphogenesis of chemically induced neoplasms of the colon and small intestine in rats. *Lab Invest*, v. 30, p. 505-13. 1974.
184. Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., and Matsukawa, A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, v. 22, p. 460-6. 2004.
185. Xie, F., Sun, S., Xu, A., Zheng, S., Xue, M., Wu, P., Zeng, J.H., and Bai, L. Advanced oxidation protein products induce intestine epithelial cell death through a redox-dependent, c-jun N-terminal kinase and poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated pathway. *Cell Death Dis*, v. 5, p. e1006. 2014.
186. Yamamoto, Y., Brodsky, M.H., Baker, J.C., and Ames, B.N. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, v. 160, p. 7-13. 1987.
187. Yang, J., Zhang, W., Evans, P.M., Chen, X., He, X., and Liu, C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem*, v. 281, p. 17751-7. 2006.
188. Zelger, B., Hittmair, A., Schir, M., Ofner, C., Ofner, D., Fritsch, P.O., Bocker, W., Jasani, B., and Schmid, K.W. Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma. *Histopathology*, v. 23, p. 257-63. 1993.

9. ANEXOS

9.1 Aprovação do comitê de Ética



9.2 Tabelas de Treinamento

Grupo R

SEMANA 1 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	12	18	21.5	x	23.4	26.4	29
C2	12	17	x	22	25	28	31
C3	12	18	21.5	26	29	31	x
C4	12	18	x	22	26	x	28
C5	12	18	22	x	23.4	26	29
C6	12	18	22	26	x	29	32
C7	12	18	22	26	x	x	x
C8	12	18	22	26	29	32	x
SEMANA 1 (QUARTA)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	14.5	22	26	X	28	30	32
C2	16	25	30	32	X	35	35
C3	16	25	30	X	32	35	X
C4	14.5	22	X	X	26	28	30
C5	14.5	22	26	28	30	32	X
C6	14.5	22	26	X	30	30	32
C7	16	X	30	32	X	35	X
C8	16	25	30	32	X	32	35
SEMANA 1 (SEXTA)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	16	25	30	32	35	36	38
C2	18	X	25	30	32	36	38
C3	16	25	30	32	34	X	36
C4	18	25	30	32	34	34	36
C5	16	X	25	30	32	35	38
C6	16	25	30	32	35	36	38
C7	18	25	30	32	34	36	38
C8	18	X	25	32	X	36	38
SEMANA 2 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	19	X	29.5	34	38	42	44
C2	19	X	29.5	34	38	42	X
C3	18	26	32	36	40	42	X
C4	18	26	32	X	40	42	44
C5	18	26	32	36	40	40	X
C6	19	29.5	36	X	38	X	X
C7	19	29.5	36	38	40	42	40
C8	19	29.5	36	38	38	40	X
SEMANA 2 (QUARTA)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	21.5	X	32	38	45	48	48
C2	21.5	32	38	42	45	48	48
C3	21.5	32	38	42	45	X	48
C4	21.5	X	38	42	45	48	X
C5	21.5	32	38	38	42	45	48
C6	18	X	X	26	30	34	X
C7	21.5	32	38	42	45	X	X

C8	21.5	32	38	42	45	48	48
SEMANA 2 (SEXTA)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	24	36	43	48	x	51	54
C2	24	36	43	48	x	x	48
C3	24	36	43	48	51	54	x
C4	24	36	43	48	51	54	57
C5	24	36	43	48	51	54	57
C6	20	30	43	41	44	48	51
C7	24	36	36	43	48	51	54
C8	24	36	36	x	41	45	48

SEMANA 3 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	28	42	51	57	61	64	64
C2	24	36	43	48	51	54	57
C3	28	41	x	51	57	x	61
C4	28	41	x	x	x	48	x
C5	28	41	48	x	51	57	x
C6	26	41	51	61	61	x	x
C7	26	41	51	x	x	48	48
C8	24	36	43	48	51	54	57
SEMANA 3 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	30	43	54	61	64	66	66
C2	30	43	54	61	64	x	66
C3	30	43	x	54	61	64	66
C4	24	36	43	48	51	54	57
C5	30	43	54	61	64	64	66
C6	30	43	x	x	54	61	x
C7	24	x	36	43	x	48	51
C8	30	43	54	61	64	66	66
SEMANA 3 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	34	x	51	61	64	67	70
C2	34	51	61	64	67	70	72
C3	34	51	61	66	66	70	72
C4	27	43	51	57	61	66	70
C5	34	51	61	66	66	70	72
C6	27	42	51	57	61	61	66
C7	27	42	51	57	x	61	x
C8	34	x	51	61	66	70	70

SEMANA 4 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	34	54	64	70	73	76	78
C2	34	54	64	70	73	76	78
C3	34	54	64	70	73	76	78
C4	34	54	x	64	70	72	76

C5	34	54	64	x	70	72	76
C6	34	54	64	70	72	76	76
C7	34	54	64	x	70	72	x
C8	34	54	64	70	72	76	x
SEMANA 4 (quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	38	57	70	70	76	79	x
C2	38	57	x	70	76	x	79
C3	38	57	x	70	76	76	79
C4	38	x	57	70	76	79	82
C5	38	57	70	76	79	82	85
C6	38	57	70	76	79	82	85
C7	38	x	57	70	x	x	64
C8	38	57	70	76	76	79	82
SEMANA 4 (sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	43	60	73	82	85	88	91
C2	43	60	73	82	x	82	82
C3	43	60	73	82	85	88	91
C4	43	60	73	82	85	x	x
C5	43	60	73	82	85	x	x
C6	43	60	73	82	85	88	x
C7	43	50	60	64	x	x	x
C8	43	60	73	82	85	88	91
SEMANA 5 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	45	67	81	93	96	x	x
C2	42	53	78	83	89	89	93
C3	47	67	81	93	96	98	98
C4	42	63	78	83	89	93	93
C5	42	63	78	83	89	93	96
C6	42	63	78	83	89	x	x
C7	38	48	57	63	x	67	67
C8	45	67	93	93	96	98	98
SEMANA 5 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	48	74	85	96	99	101	106
C2	48	74	85	96	99	101	106
C3	48	74	85	96	99	101	106
C4	48	74	85	96	99	101	106
C5	48	74	85	96	99	101	106
C6	48	74	x	x	85	88	91
C7	38	48	57	74	78	x	x
C8	48	74	85	96	99	101	106
SEMANA 5 (sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	48	74	85	96	99	101	106
C2	48	74	85	96	99	101	106
C3	48	74	85	96	99	101	106

C4	48	74	85	96	99	101	106
C5	48	74	85	96	99	101	106
C6	48	74	x	x	85	88	91
C7	38	48	57	74	78	x	x
C8	48	74	85	96	99	101	106

SEMANA 6 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	52	78	92	106	x	109	112
C2	52	78	92	106	109	112	112
C3	52	78	x	92	106	109	x
C4	52	78	92	106	109	112	115
C5	52	78	92	106	109	112	115
C6	52	74	88	99	102	106	109
C7	38	54	74	78	81	83	88
C8	52	78	92	x	106	109	x
SEMANA 6 (quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	51	84	99	x	112	x	115
C2	51	84	99	x	x	x	112
C3	x	56	84	99	112	115	117
C4	56	84	99	112	115	117	120
C5	56	84	99	112	115	117	120
C6	56	84	99	x	x	112	x
C7	44	66	80	88	92	x	95
C8	56	84	99	112	115	117	120
SEMANA 6 (sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	58	85	109	117	120	123	x
C2	58	x	85	117	120	x	x
C3	58	x	109	x	109	117	120
C4	58	85	109	117	120	123	126
C5	58	85	109	117	120	123	126
C6	58	85	109	117	x	x	x
C7	48	74	x	x	x	74	85
C8	58	85	109	117	120	x	123

SEMANA 7 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	59	95	109	120	123	126	129
C2	59	95	109	120	123	126	x
C3	59	95	109	x	109	x	120
C4	59	95	109	120	123	126	129
C5	59	95	109	120	123	126	x
C6	59	95	109	120	123	x	126
C7	44	63	x	x	70	x	x
C8	59	95	109	120	123	x	126
SEMANA 7 (quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7

C1	63	95	115	126	129	x	132
C2	63	95	115	126	129	x	132
C3	63	95	115	126	129	x	129
C4	63	95	115	126	129	x	x
C5	63	95	115	126	x	129	132
C6	63	95	115	126	129	132	135
C7	35	52	63	72	75	78	81
C8	63	95	115	126	129	132	x
SEMANA 7 (sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C1	66	99	120	132	135	138	x
C2	66	99	120	132	135	138	140
C3	66	99	120	132	135	138	140
C4	66	99	120	132	135	138	140
C5	66	99	120	132	135	138	140
C6	66	99	120	132	135	138	140
C7	55	60	72	81	84	87	x
C8	66	99	120	132	135	x	135

Cargas estão expressas em gramas (g). X subida não executada. Série de aquecimento, sem carga em g, não está representada na tabela

Grupo RT

SEMANA 1 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	12	18	22	26	x	29	32
C10	12	x	22	26	29	32	32
C11	12	18	18	x	22	26	x
C12	12	18	22	26	29	32	32
C13	12	18	22	26	29	32	32
C14	12	18	22	26	29	32	32
C16	12	18	x	23	26	29	x
SEMANA 1 (quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	16	25	25	30	32	35	35
C10	16	25	30	32	X	X	35
C11	16	X	30	32	35	35	35
C12	16	25	30	32	35	37	37
C13	16	25	30	32	35	35	X
C14	16	25	30	32	35	35	35
C16	14.5	25	30	32	35	35	35
SEMANA 1 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	16	25	X	30	32	X	35
C10	18	25	30	32	34	36	X
C11	18	25	30	X	32	36	38
C12	18	X	25	30	32	36	38
C13	18	X	25	30	32	36	X
C14	18	25	30	32	34	36	38
C16	18	25	30	32	32	38	38

SEMANA 2 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	18	26	32	36	42	42	44
C10	18	26	32	36	42	42	44
C11	19	29.5	34	34	34	34	X
C12	19	29.5	34	38	40	42	44
C13	18	29.5	32	36	36	X	34
C14	19	29.5	34	38	X	42	X
C16	19	29.5	34	38	42	42	44
SEMANA 2 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	21.5	32	38	42	X	X	42
C10	21.5	32	38	42	45	48	X
C11	18	26	30	34	38	41	X
C12	21.5	32	38	42	45	48	48
C13	21.5	26	30	34	X	34	38
C14	18	32	38	42	45	48	48
C16	21.5	32	38	42	45	48	48
SEMANA 1 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	20	30	36	x	41	44	48
C10	24	36	43	48	51	54	57
C11	20	30	36	41	41	44	x
C12	24	36	43	48	51	54	57
C13	20	24	30	36	x	41	45
C14	24	36	43	48	51	54	57
C16	24	36	43	48	51	57	x
SEMANA 3 (SEG)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	24	36	43	48	51	51	57
C10	26	41	51	57	61	61	x
C11	24	36	43	48	51	54	57
C12	26	43	51	57	61	54	64
C13	24	38	43	x	48	51	x
C14	26	43	48	51	57	61	x
C16	26	43	51	57	x	61	64
SEMANA 3 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	30	43	54	61	64	64	66
C10	30	43	54	61	64	66	x
C11	30	43	54	61	64	66	68
C12	30	43	54	61	64	66	68
C13	24	36	x	43	48	51	54
C14	30	43	54	61	64	66	68
C16	30	43	54	61	64	66	68
SEMANA 3 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	34	51	57	61	66	70	72
C10	34	51	57	61	66	70	70
C11	34	51	57	61	66	70	70

C12	34	51	57	61	66	70	72
C13	27	43	57	57	61	66	72
C14	34	51	57	61	66	70	72
C16	34	51	57	61	66	70	72

SEMANA 4 (Segunda)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	34	54	64	70	72	76	76
C10	34	x	54	64	70	72	76
C11	34	54	64	70	72	76	76
C12	34	54	64	70	72	76	78
C13	34	51	61	64	70	72	76
C14	34	54	64	70	72	76	76
C16	34	54	64	70	72	76	76
SEMANA 4 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	38	57	70	76	79	82	85
C10	38	57	70	76	79	82	85
C11	38	57	70	76	x	76	x
C12	38	57	70	76	79	82	85
C13	38	57	70	76	76	79	79
C14	38	57	70	76	79	82	85
C16	38	57	70	76	79	82	x
SEMANA 4 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	43	60	73	82	85	88	91
C10	43	60	73	82	85	88	91
C11	38	54	70	73	76	80	85
C12	43	60	73	82	85	88	91
C13	43	60	73	82	85	88	91
C14	43	60	73	82	85	88	x
C16	43	60	73	82	x	85	88

SEMANA 5 (Segunda)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	45	67	81	93	96	96	98
C10	45	67	81	93	96	96	x
C11	42	67	81	83	89	89	x
C12	45	67	81	x	93	93	98
C13	45	63	78	93	88	88	x
C14	45	67	81	93	96	96	98
C16	45	67	81	93	96	96	98
SEMANA 5 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	48	74	85	96	99	101	x
C10	48	74	85	96	x	99	x
C11	48	74	85	96	99	101	106
C12	48	74	85	96	99	101	106
C13	48	74	85	96	96	x	106

C14	48	74	85	96	99	101	106
C16	48	74	85	96	99	101	106
SEMANA 5 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	48	74	85	96	99	101	x
C10	48	74	85	96	x	99	x
C11	48	74	85	96	99	101	106
C12	48	74	85	96	99	101	106
C13	48	74	85	96	96	x	106
C14	48	74	85	96	99	101	106
C16	48	74	85	96	99	101	106

SEMANA 6 (Segunda)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	50	74	88	99	102	109	112
C10	50	74	88	99	102	106	109
C11	52	78	92	106	109	112	115
C12	52	78	92	106	109	112	115
C13	50	74	88	99	102	106	109
C14	52	78	91	106	109	112	112
C16	52	78	91	106	x	x	109
SEMANA 6 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	56	84	99	x	x	112	115
C10	56	84	99	x	x	112	x
C11	56	84	99	112	115	117	x
C12	56	84	99	112	115	117	120
C13	56	84	99	112	115	x	115
C14	56	84	99	112	115	117	120
C16	56	84	99	112	115	117	120
SEMANA 6 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	58	85	109	117	x	120	123
C10	58	85	109	117	x	x	x
C11	58	85	109	117	120	123	126
C12	58	85	109	117	x	123	126
C13	58	85	109	117	120	x	117
C14	58	85	109	117	120	123	126
C16	58	85	109	117	120	123	120

SEMANA 7 (Quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	59	95	109	120	x	x	x
C10	59	95	109	120	123	126	129
C11	59	95	109	120	123	126	x
C12	59	95	109	120	123	126	129
C13	59	95	109	x	120	123	x
C14	59	95	109	120	123	126	129
C16	59	95	109	120	123	126	129

SEMANA 7 (quarta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	63	95	115	126	126	129	x
C10	63	95	115	126	129	132	135
C11	63	95	115	126	129	132	135
C12	63	95	115	126	129	132	x
C13	63	95	115	126	129	129	x
C14	63	95	115	126	129	132	135
C16	63	95	115	126	129	132	135
SEMANA 7 (Sexta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C9	66	99	120	x	132	135	135
C10	66	99	120	x	x	132	135
C11	66	99	120	132	135	138	140
C12	66	99	120	132	135	138	140
C13	66	99	120	132	135	138	140
C14	66	99	120	132	x	x	132
C16	66	99	120	132	135	138	140

Cargas estão expressas em gramas (g). X subida não executada. Série de aquecimento, sem carga em g, não está representada na tabela

Grupo C

SEMANA 1 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	12	18	22	x	26	30	30
C18	12	18	22	26	30	34	34
C19	12	18	22	26	30	34	34
C20	12	18	22	26	30	34	x
SEMANA 1 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	14.5	22	26	30	32	x	x
C18	14.5	x	22	26	x	x	30
C19	14.5	22	x	x	25	30	32
C20	14.5	22	x	x	x	x	x
SEMANA 2 (terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	16	24	26	29.5	32	34	34
C18	16	26	29.5	32	34	38	40
C19	18	26	29.5	32	x	34	38
C20	18	26	x	29.5	34	38	40
SEMANA 2 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	x	17	26	34	38	41	45
C18	20	30	36	41	45	48	45
C19	20	30	36	41	x	41	45
C20	20	30	36	41	45	48	x
SEMANA 3 (terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	24	36	43	48	51	x	54
C18	24	36	43	48	51	54	54
C19	24	36	43	48	x	48	54
C20	24	36	43	x	48	48	x

SEMANA 3 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	x	27	41	48	54	57	61
C18	27	42	54	54	57	61	64
C19	24	36	48	51	54	57	61
C20	24	36	48	x	54	54	57
SEMANA 4 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	34	48	61	x	x	64	67
C18	34	x	48	61	x	64	x
C19	34	48	61	64	76	70	73
C20	27	38	43	51	57	61	64
SEMANA 4 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	36	54	64	70	73	76	76
C18	36	54	64	70	73	76	76
C19	36	54	64	70	x	x	64
C20	34	48	60	64	67	70	x
SEMANA 5 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	38	57	70	76	79	82	x
C18	38	x	57	70	x	76	82
C19	34	48	57	64	67	70	76
C20	38	57	70	76	79	82	82
SEMANA 5 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	42	63	74	83	x	x	x
C18	42	63	74	83	x	85	88
C19	38	57	70	74	78	85	88
C20	42	63	74	83	85	88	91
SEMANA 6 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	44	65	80	88	x	92	95
C18	44	65	80	88	92	95	x
C19	44	65	80	88	92	95	99
C20	44	65	80	88	92	x	x
SEMANA 6 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	48	74	84	95	x	x	x
C18	48	74	x	84	95	99	102
C19	48	74	84	95	99	102	106
C20	48	74	84	95	99	102	x
SEMANA 7 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	48	72	85	x	95	95	x
C18	52	78	92	105	107	109	111
C19	52	78	92	105	107	109	109
C20	52	78	92	105	107	109	x
SEMANA 7 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C17	48	72	85	95	98	x	98
C18	55	82	100	109	112	115	118
C19	55	82	100	109	112	115	118
C20	55	82	100	x	109	x	x

Cargas estão expressas em gramas (g). X subida não executada. Série de aquecimento, sem carga em g, não está representada na tabela

Grupo CT

SEMANA 1 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	12	x	22	x	30	x	30
C27	12	18	22	26	x	x	30
C29	x	18	22	x	26	30	30
C30	x	18	22	26	x	x	30
C31	12	x	22	x	26	26	x
SEMANA 1 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	14.5	22	25	30	x	32	x
C27	14.5	22	25	30	32	34	34
C29	14.5	22	x	25	30	32	34
C30	14.5	22	25	30	32	x	34
C31	14.5	22	x	25	30	32	x
SEMANA 2 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	18	24	29.5	32	32	34	x
C27	18	24	26	29.5	32	34	x
C29	18	24	26	29.5	32	x	38
C30	18	24	29.5	32	34	38	40
C31	18	24	29.5	32	34	38	40
SEMANA 2 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	x	17	26	30	x	x	34
C27	17	26	30	x	x	x	x
C29	20	x	30	36	x	36	36
C30	20	30	36	41	x	45	48
C31	20	30	36	41	x	x	45
SEMANA 3 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	17	24	30	34	38	41	x
C27	17	24	30	34	38	41	48
C29	17	24	30	34	38	41	48
C30	24	36	43	48	48	54	54
C31	24	36	43	48	48	54	x
SEMANA 3 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	24	36	43	48	x	x	51
C27	24	36	43	48	51	x	51
C29	24	36	48	48	51	54	57
C30	27	41	48	54	57	61	64
C31	27	41	48	54	57	61	64
SEMANA 4 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	27	38	43	51	57	61	64
C27	27	38	43	51	57	61	64
C29	34	48	61	64	67	70	73
C30	34	48	61	64	67	70	73

C31	34	48	61	64	67	70	73
SEMANA 4 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	34	48	60	64	x	x	64
C27	34	48	60	64	67	70	73
C29	36	54	64	70	73	76	76
C30	36	54	64	70	73	76	79
C31	34	54	x	64	70	73	76
SEMANA 5 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	34	43	x	57	x	64	x
C27	38	57	70	76	79	82	82
C29	38	57	70	76	79	79	82
C30	38	57	70	76	79	82	82
C31	38	57	70	76	79	82	82
SEMANA 5 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	30	42	57	63	66	70	70
C27	42	63	74	83	85	88	91
C29	42	63	x	74	83	85	88
C30	42	63	74	84	85	88	91
C31	42	63	74	83	85	88	91
SEMANA 6 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	35	52	64	74	80	88	92
C27	44	65	80	88	92	95	99
C29	44	65	80	88	92	92	95
C30	44	65	80	88	92	95	99
C31	44	65	80	88	92	95	x
SEMANA 6 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	48	74	84	95	99	102	106
C27	48	74	84	95	99	102	106
C29	48	74	84	95	99	102	106
C30	48	74	84	95	99	102	106
C31	48	74	84	95	99	102	106
SEMANA 7 (Terça)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	52	78	x	92	x	105	107
C27	52	78	92	105	107	109	111
C29	52	78	92	105	107	109	111
C30	52	78	92	105	107	109	111
C31	52	78	92	105	107	109	x
SEMANA 7 (Quinta)	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7
C25	55	82	100	109	x	x	109
C27	55	82	100	109	112	115	117
C29	55	82	100	109	112	115	118
C30	55	82	100	109	112	115	118
C31	55	82	100	109	112	115	118

Cargas estão expressas em gramas (g). X subida não executada. Série de aquecimento, sem carga em g, não está representada na tabela

