UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral

Gabriel Cardial Tobias

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral

Gabriel Cardial Tobias

São Paulo

2017

GABRIEL CARDIAL TOBIAS

Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral

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

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patricia Chakur Brum

São Paulo

2017

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

Tobias, Gabriel Cardial

Contribuição de atividade aeróbia para a resposta imune
antitumoral / Gabriel Cardial Tobias. – São Paulo : [s.n.], 2017.
96p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte
da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

1. Atividade física 2. Atividade aeróbia 3. Câncer I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TOBIAS, Gabriel Cardial

Título: Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Raquel Lugaresi por me inspirar a ser uma pessoa melhor. Agradeço pela oportunidade de conviver e aprender com a pessoa mais inteligente que já conheci. Sua inteligência imensurável é a minha maior motivação para continuar estudando e pesquisando. Pessoas geniais são raríssimas, mas pessoas geniais com compaixão e empatia são tão raras quanto um arco-íris lunar. Nunca serei que nem você, mas gostaria que existissem mais pessoas semelhantes a você no mundo.

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

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da EEFE-USP. Agradeço por terem me aceitado da maneira que sou, pelas incontáveis risadas e pelas conversas aleatórias e sem sentido do dia-a-dia. Vocês, pela primeira vez, ensinaram-me o valor da amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro durante todo o processo (2014/25830-9).

À Prof^a. Dr^a. Patricia Chakur Brum por me aceitar em seu laboratório mesmo sabendo que eu era cheio de limitações e imperfeições.

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

Por fim, agradeço à todos aqueles que esqueci. Embora eu não me lembre de vocês, sem dúvida vocês deixaram alguma marca em mim que me fez ser o que sou, tanto para o bem quanto para o mal.

“Para morrer, basta estar vivo”

Martin Heidegger

RESUMO

TOBIAS, GABRIEL CARDIAL. **Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017

A atividade física aeróbia reduz a incidência de diversos tipos de câncer e atenua o crescimento tumoral. Entretanto, existe uma lacuna na literatura sobre os mecanismos envolvidos nessa resposta. Dados recentes demonstram a importância da manutenção da função da resposta imune antitumoral para a atenuação da progressão da doença e estratégias capazes de aumentar essa resposta permanecem como um grande desafio. Diante disso, delineamos um estudo experimental para investigar especificamente a possível contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral. Na presente dissertação, nós demonstramos que a atividade física aeróbia possui o potencial alterar a resposta de marcadores relacionados a resposta imune antitumoral. Em um primeiro estudo, observamos que a atividade física aeróbia atenuou o crescimento tumoral em três diferentes modelos de câncer em animais, assim como aumentou a sobrevida de animais com melanoma B16F10. Além disso, nós observamos que a atividade física aeróbia também altera a expressão gênica de marcadores de os linfócitos T infiltrantes de tumor (do inglês *tumor infiltrating lymphocytes T* – TILs-T) e de macrófagos associados ao tumor (do inglês *tumor-associated macrophages* – TAMs). Em segundo estudo, nosso objetivo foi explorar através de análises *in silico* respostas imunes tumorais que poderiam estar sendo moduladas pela atividade física aeróbia. Por meio da análise de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), observamos que a atividade física aeróbia prévia gerou uma assinatura imunológica tumoral semelhante à de pacientes com diferentes tipos de câncer e maior sobrevida. Essa assinatura imunológica revelou que pacientes com câncer de mama e melanoma que apresentam alta expressão gênica de BTG2, CD69, CFH, DUSP1 e PTGER4 em seus tumores, apresentam maior sobrevida em comparação aos pacientes com baixa expressão desses genes em seus tumores. A análise de GSEA também demonstrou que a atividade física aeróbia foi capaz de induzir uma assinatura imunológica semelhante à de animais com melanoma B16F10 sensíveis ao tratamento com o imunoterápico anti-CTLA-4 (do inglês *anti- cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) e pacientes pós-tratamento com anti-CTLA-4. Essa assinatura imunológica também revelou que pacientes com melanoma que apresentam alta expressão gênica de PHC3, TET2, MACF1 e PARP8 em seus tumores, apresentam maior sobrevida em comparação aos pacientes com baixa expressão desses genes em seus tumores. Em conclusão, a atividade física aeróbia demonstra-se como uma potente ferramenta no combate a progressão da doença.

Palavras-chave: Atividade física aeróbia; Câncer; Crescimento tumoral; Resposta imune antitumoral; GSEA

ABSTRACT

TOBIAS, GABRIEL CARDIAL. **The contribution given by the aerobic physical activity to the antitumor immune response.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017

It is already very well accepted that the aerobic physical activity reduces the incidence of many different types of cancer and mitigates the tumor progression. However, there is an investigation gap on the literature about the mechanisms underlying this response. Recently, a body of literature has arisen which show the importance of maintain antitumoral immune response to mitigated tumor progression, and strategy for enhance this response remains a major challenge. Presently, we demonstrate that the aerobic physical activity has the potential to modulate antitumor immune responses. Firstly, we have observed that the aerobic physical activity mitigated the tumor progression in three different animal models of cancer and increased survival in the animals which had B16F10 melanoma. Moreover, we have observed that the aerobic physical activity also seems modulate the tumor infiltrating T lymphocytes (TILs-T) and the tumor associated macrophages (TAMs) in as specific-tumor way. Based on the computer gene set enrichment analysis (GSEA), we have observed that the previous aerobic physical activity helped to develop an immunological signature of the tumor shared among patients with different cancer etiologies with higher survival over time. This signature introduced us to some genes that are associated with a higher survival over time when increased in tumors of patients with melanoma, breast cancer and lymphoma. The GSEA analysis also shows that the aerobic physical activity is able to introduce an immune signature similar to the one observed in animals with B16F10 melanoma sensitive to the immunotherapeutic anti- cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (anti-CTLA-4) and patients post treatment with anti-CTLA-4. This immune signature also revealed genes with a strong association with high survival over time. This immune signature also revealed genes associated with a higher survival over time when their expression were increased in melanoma patients. In conclusion, aerobic physical activity is a powerful tool to counteract tumor progression due to its capacity to modulate antitumor immune responses.

Keywords: Aerobic physical activity; Cancer; Tumor progression; antitumor immune response; GSEA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Drogas que podem interferir com cada uma das capacidades adquiridas necessárias para o crescimento e progressão tumoral. Adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2011).....	4
Figura 2. Desenho experimental da caracterização do modelo de atividade física espontânea diária ..	13
Figura 3. Desenho experimental do ESTUDO I.....	14
Figura 4. Desenho experimental do ESTUDO II.	15
Figura 5: Desempenho entre os grupos Wheel Running e SED. A: velocidade máxima atingida no teste progressivo máximo. B: distância total percorrida no teste progressivo máximo. C: média da distância diária percorrida na roda de atividade física voluntária durante 120 dias. D: massa corporal. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de dois fatores, seguida de pos hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	24
Figura 6: Correlação do delta da distância e da velocidade máxima atingida no teste progressivo máximo com a média do volume diário percorrido na roda de atividade física voluntária nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias. Para a análise estatística foi realizada a correlação de Pearson.	26
Figura 7: Efeitos da atividade física aeróbia sobre o crescimento tumoral. A-D: Volume tumoral durante o curso temporal e volume tumoral ex-vivo mensurado no momento do sacrifício dos animais para os modelos de câncer B16, LLC, CT26 e 4T1. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de dois fatores e teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	29
Figura 8: Efeitos da atividade física aeróbia sobre a iniciação tumoral (1ª identificação tumoral). A-C: Porcentagem de animais sem tumor e porcentagem de animais com tumor após a inoculação das células tumorais B16, LLC, CT26 e 4T1.	31
Figura 9: Efeitos da atividade física aeróbia sobre a massa baço. A: Massa do baço dos animais C57BL6 machos que realizaram atividade física aeróbia voluntária prévia e foram injetados com as células tumorais do melanoma B16 e LLC. B: Massa do baço dos animais Balb/c fêmeas que realizaram treinamento físico aeróbio prévia e foram injetados com as células tumorais do melanoma CT26 e 4T1. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA de dois fatores seguida de <i>pos hoc</i> de Bonferroni e teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	32
Figura 10: Efeitos da atividade física aeróbia sobre a resposta dos TILs-T e dos TAMs. Análise de qPCR para marcadores relacionados à resposta dos TILs-T e dos TAMs nos tumores B16 (A), CT26 (B) e 4T1 (C). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	36
Figura 11: Efeitos da atividade física aeróbia sobre sobrevida do a animais inoculados com as células tumorais do melanoma B16. A: tempo até a exaustão no teste progressivo máximo. B: curva de sobrevida após a inoculação das células tumorais. C: curva de sobrevida após a primeira identificação	

do tumor. D: tempo para o surgimento do tumor após a inoculação das células tumorais B16. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de dois fatores, seguida de <i>pos hoc</i> de Bonferroni e Log-rank. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	39
Figura 12: Impacto da sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A-M: Tempo de sobrevida global entre os pacientes dos grupos “Morto” e “Vivo” para os diferentes <i>datasets</i> utilizados. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste <i>t</i> de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	43
Figura 13: Impacto da sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Comparação realizada através GSEA entre os grupos “Morto” e “Vivo” dos diferentes <i>datasets</i> utilizados. Para 7 dos 13 <i>datasets</i> analisados pelo GSEA a partir da base de dados de “ <i>Immunologic signatures</i> ” (MSigDB, C7) houve o enriquecimento de assinaturas imunológicas ou para o grupo “Morto”, ou para o grupo “Vivo” ou para ambos os grupos de cada um dos <i>datasets</i> . A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes <i>datasets</i> que apresentaram enriquecimento de assinaturas imunológicas para o grupo “Morto”. B: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes <i>datasets</i> que apresentaram enriquecimento de assinaturas imunológicas para o grupo “Vivo”.....	44
Figura 14: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Morto”) e Melanoma (SED). B: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Vivo”) e Melanoma (SED). C: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Vivo”) e Melanoma (Exer). D: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Morto”) e Melanoma (Exer).	46
Figura 15: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes <i>datasets</i> para o grupo “Vivo” e Melanoma (Exer). B: Plots de enriquecimento gerados pelo GSEA para a assinatura imunológica compartilhada (GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP). Os gráficos mostram a assinatura gênica da assinatura imunológica compartilhada.	47
Figura 16: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A-E: Heatmap dos genes que participam do core de enriquecimento para a assinatura imunológica (GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP) compartilhada entre os diferentes <i>datasets</i> . F: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento dos genes que participam do core de enriquecimento entre os diferentes <i>datasets</i>	48
Figura 17: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com melanoma metastático com alta expressão de BTG2, CFH, DUSP1, PTGER4, CD69 e JUNB (azul) e baixa expressão de BTG2, CFH, DUSP1, PTGER4, CD69 e JUNB (vermelho). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Melanoma Metastatic – Bhardwaj – 44 – fRMA – u133p2” (http://r2.amc.nl).....	50

Figura 18: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com câncer de mama com alta expressão de BTG2, CD69, CFH, DUSP1, PTGER4 e JUNB (azul) e baixa expressão de BTG2, CD69, CFH, DUSP1, PTGER4 e JUNB (vermelho). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Breast – Bergh – 159 – MAS5.0 – u133a” (http://r2.amc.nl).....	51
Figura 19: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com linfoma com alta expressão de BTG2, CFH, DUSP1, JUNB, CD69 e PTGER4 (azul) e baixa expressão de BTG2, CFH, DUSP1, JUNB, CD69 e PTGER4 (vermelho). A sobrevida analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Lymphoma (T-cell Peripheral) – Rosenwald – 193 – MAS5.0 – u133p2” (http://r2.amc.nl).	52
Figura 20: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com câncer de ovário com alta expressão de PTGER4, CD69, BTG2, CFH, DUSP1 e JUNB (azul) e baixa expressão de PTGER4, CD69, BTG2, CFH, DUSP1 e JUNB (vermelho). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Ovarian – Pamula-Pilat – 101 – MAS5.0 – u133p2” (http://r2.amc.nl).....	53
Figura 21: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento dos genes associados com a sobrevida dos pacientes com melanoma e câncer de mama (Figuras 15 e 16) e que participam do core de enriquecimento entre o Melanoma (Vivo) e o Mama (Vivo). B-D: Heatmap dos genes compartilhados e associados com a sobrevida dos pacientes com Melanoma (D) e Câncer de Mama (C) e com o Melanoma B16F10 (B).....	54
Figura 22: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 19A-D) em diferentes tecidos (http://biogps.org - GSE10246).....	55
Figura 23: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 19A-D) em diferentes populações de células imunes (https://www.immgen.org - GSE15907 e GSE37448).	55
Figura 24: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 19A-D) em diferentes populações de células imunes (https://www.immgen.org - GSE15907 e GSE37448).	56
Figura 25: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Expressão de PTGER4, BTG2, DUSP1, CD69 e CFH em células tumorais do câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento aeróbio durante 12 semanas. B: Expressão de CFH, PTGER4, BTG2, DUSP1 e CD69 nos tumores 4T1 no modelo de câncer de mama submetido ao treinamento físico aeróbio prévio no nosso estudo. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste <i>t</i> de Student para dados não pareados bicaudal. * <i>p</i> < 0.05, ** <i>p</i> < 0.01.	57
Figura 26: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes <i>datasets</i> para o grupo “anti-CTLA-4” e Melanoma (Exer). B: Plots de enriquecimento	

gerados pelo GSEA para a assinatura imunológica compartilhada (GSE7509_UNSTIM_VS_FCGRIB_STIM_MONOCYTE_DN). Os gráficos mostram a assinatura gênica da assinatura imunológica compartilhada.	59
Figura 27: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. A-C: Heatmap dos genes que participam do core de enriquecimento para a assinatura imunológica (GSE7509_UNSTIM_VS_FCGRIB_STIM_MONOCYTE_DN) compartilhada entre os diferentes <i>datasets</i> . F: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento dos genes que participam do core de enriquecimento entre os diferentes <i>datasets</i>	60
Figura 28: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com melanoma metastático com alta expressão de PHC3, TET2, MACF1, PARP8, NFAT5, MTX3 e SON (azul) e baixa expressão de PHC3, TET2, MACF1, PARP8, NFAT5, MTX3 e SON (vermelho). A sobrevida foi calculada com o “R2: Tumor Melanoma Metastatic – Bhardwaj – 44 – fRMA – u133p2” dataset (http://r2.amc.nl).	61
Figura 29: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 25A-D) em diferentes tecidos (http://biogps.org - GSE10246).	62
Figura 30: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 25A-D) em diferentes populações de células imunes (https://www.immgen.org - GSE15907 e GSE37448).	62
Figura 31: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 25A-D) em diferentes populações de células imunes (https://www.immgen.org - GSE15907 e GSE37448).	63
Figura 32: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão de TET2, MACF1, PARP8 e PHC3 em células tumorais do câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento aeróbio durante 12 semanas. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste <i>t</i> de Student para dados não pareados bicaudal. * <i>p</i> < 0.05.	64

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\dot{V}O_2$ máx.	Consumo máximo de oxigênio
4T1	Câncer de mama 4T1
Akt	<i>Protein kinase B</i>
B16	Melanoma B16F10
BTG2	<i>BTG anti-proliferation factor 2</i>
CD11c	<i>Integrin subunit alpha X</i>
CD69	<i>Early activation antigen CD69</i>
Células NK	<i>Natural killers cell</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFH	<i>Complement factor H</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT26	Câncer de cólon 26
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DUSP1	<i>Dual specificity protein phosphatase 1</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Fizz1	<i>Resistin like alpha</i>
FoxO	<i>Forkhead box protein O</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
Glut1	<i>Solute carrier family 2-facilitated glucose transporter-, member</i>
<i>I</i>	
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HCR	<i>High capacity runners</i>
Hif1 α	<i>Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit</i>
IFN- γ	<i>Interferon gama</i>

IL-35	Interleucina 35
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
JUNB	<i>Transcription factor jun-B</i>
Lag3	<i>Lymphocyte activating 3</i>
LCR	<i>Low capacity runners</i>
LLC	Carcinoma pulmonar de Lewis
MACF1	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1</i>
mDC	Células dendríticas mielóides
Mgl1	<i>C-type lectin domain family 10, member A</i>
MTX3	<i>Metaxin-3</i>
NFAT5	<i>Nuclear factor of activated T-cells 5</i>
PARP8	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 8, SON - SON DNA binding protein</i>
PD-1	<i>Programmed death protein 1</i>
PD-L1	<i>CD274 antigen</i>
PGC1- α	<i>Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha</i>
PHC3	<i>Polyhomeotic-like protein 3</i>
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>
PTGER4	<i>Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype</i>
Redd1	<i>DNA damage inducible transcript 4</i>
SED	Sedentários
TAMs	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TET2	<i>Methylcytosine dioxygenase Ten-Eleven-Translocation-2,</i>
TILs-T	<i>Tumor infiltrating lymphocytes T</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
Treg	Células T regulatórias
TSST	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>
Vegf α	<i>Vascular endothelial growth factor α</i>
Wheel Running	Atividade física voluntária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
3 OBJETIVOS	12
3.1 Geral	12
3.2 Específicos.....	12
4 MÉTODOS	16
4.1 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	16
4.2 Animais.....	16
4.3 Protocolo de atividade física voluntária	16
4.4 Protocolo de atividade física estruturada (treinamento físico)	17
4.5 Cultura de células tumorais	17
4.6 Crescimento tumoral e massa corporal	17
4.7 Método de sacrifício.....	18
4.8 Expressão gênica	18
4.9 Gene set enrichment analysis (GSEA)	18
4.10. GSE utilizados.....	20
4.11 Análise de sobrevida	21
4.12 Diagrama de Venn	21
4.13 Análise Estatística	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1: Caracterização do modelo de atividade física espontânea diária.....	23
5.2 ESTUDO I - Efeitos da atividade física aeróbia sobre o crescimento tumoral	27
5.2.1 Efeitos da atividade física aeróbia sobre a resposta dos TILs-T e dos TAMs	33
5.3 ESTUDO II: Impacto da atividade física aeróbia prévia sobre a sobrevida de camundongos com câncer.....	37
5.4 ESTUDO III: Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral.....	39
5.4.1 Impacto da sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral	40
5.4.2. Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral	44
5.4.3. Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral.....	58
6 CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS	68
8 ANEXOS.....	74
Anexo 1. Cópias das aprovações (e adendos) no CEUA	74
Anexo 2. Menção Honrosa FeSBE 2017	78

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um notório avanço no tratamento dos mais diversos tipos de câncer, melhorando expressivamente o prognóstico dos pacientes (DESANTIS et al., 2014). No entanto, o câncer ainda continua sendo a segunda principal causa de morte no mundo e, se observados apenas os países desenvolvidos, o câncer é a principal causa de morte (STEWART; WILD, 2014; TORRE et al., 2015). Diante disso, estratégias capazes de retardar a iniciação e atenuar o crescimento e agressividade tumoral demonstram-se de fundamental importância para a diminuição da incidência e mortalidade provocada pela doença.

Nesse contexto, dados recentes demonstram a importância da manutenção da resposta imune antitumoral para a atenuação da progressão da doença, uma vez que, tumores são capazes de desenvolver mecanismos de escape e resistência à resposta imunológica (HANAHA; WEINBERG, 2011). Nesse sentido, dentre os principais recursos para essa resistência à resposta imune antitumoral destacam-se a exaustão e disfunção metabólica dos linfócitos T infiltrantes de tumor (do inglês *tumor infiltrating lymphocytes T* – TILs-T) (BRAND et al., 2016; CHANG et al., 2015; PIETROCOLA et al., 2016; SCHARPING et al., 2016) e a disfunção do metabolismo de macrófagos associados ao tumor (do inglês *tumor-associated macrophages* – TAMs) (CASAZZA et al., 2013; COLEGIO et al., 2014; GORDON et al., 2017; RIES et al., 2014; WENES et al., 2016) que ocorrem no microambiente tumoral e parecem favorecer a progressão da doença.

Diversos são os mecanismos envolvidos na exaustão dos TILs-T. Dentre estes, podemos destacar a diminuição do conteúdo mitocondrial dos TILs-T (SCHARPING et al., 2016), o consumo de ácido lático derivado do metabolismo das células tumorais pelos TILs-T e pelas *natural killers cell* (células NK) infiltrantes de tumor (BRAND et al., 2016), o aumento da produção de interleucina 35 (IL-35) pelas células T regulatórias (Treg) (TURNIS et al., 2016) e a diminuição da oferta de glicose para os TILs-T em virtude da competição por nutrientes entre as células tumorais e as células do sistema imune (CHANG et al., 2015). Em conjunto, esses mecanismos reduzem a função citotóxica dos TILs-T o que limita a imunidade antitumoral. Entretanto, quando esses mecanismos são bloqueados, o crescimento tumoral é reduzida em decorrência do restabelecimento da função dos TILs-T. Nesse sentido, os tratamentos envolvendo imunoterapias, principalmente a imunoterapia com anti-CTLA-4 (do inglês *cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4*) e anti-PD-1 (do inglês *programmed*

death protein 1), parecem promover resultados promissores no combate à progressão da doença (HAMID et al., 2013; HODI et al., 2010; TOPALIAN et al., 2012).

Em relação aos mecanismos envolvidos na disfunção dos TAMs, Wenes *et al.* demonstraram que nas regiões de hipóxia tumoral ocorre aumento dos níveis de RNAm de *Redd1* (*DNA damage inducible transcript 4*) nos TAMs, debilitando o seu metabolismo glicolítico o que favorece a neo-vascularização em virtude do consumo exacerbado de glicose pelas células endoteliais tumorais (WENES et al., 2016). Quando o metabolismo glicolítico dos TAMs é restaurado pela inibição da expressão exacerbada de *Redd1*, ocorre neo-vascularização funcional do tumor e aumento da sobrevida dos animais (WENES et al., 2016).

Em paralelo com a terapia farmacológica do câncer, sabe-se que a prática regular de atividade física resulta em uma série de adaptações benéficas ao organismo, tendo como resposta fundamental a melhora da capacidade física (EGAN; ZIERATH, 2013). No contexto do câncer, Moore *et al.* (2016) demonstraram que a prática regular de atividade física aeróbia resultou na redução da incidência de 13 tipos de câncer do total de 26 analisados em 1,44 milhões de adultos (MOORE et al., 2016). Recentemente, Pedersen *et al.* (2016) demonstraram que quatro semanas de atividade física voluntária prévia foi capaz de retardar a iniciação tumoral e reduzir o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em camundongos (PEDERSEN et al., 2016). Foi mostrado que a atividade física aumenta a mobilização e redistribuição das células NK para o microambiente tumoral. Os mecanismos envolvidos nessas respostas estariam relacionados ao aumento de interleucina 6 (IL-6) e epinefrina circulantes induzidos pela atividade física. Com isso, ocorreria a mobilização e redistribuição das células NK⁺IL-6⁺ do baço para a circulação e, posteriormente, da circulação para o microambiente tumoral. Esse aumento de células NK no microambiente tumoral estava relacionado com a atenuação do crescimento tumoral. Importante ressaltar que também foi observada atenuação do crescimento tumoral quando os animais realizaram apenas a atividade física aeróbia prévia, permanecendo sedentários após a inoculação das células tumorais. Além disso, também foi observado aumento de TILs-T induzido pela atividade física (PEDERSEN et al., 2016). Esses resultados sugerem que possam haver outros mecanismos envolvidos na atenuação do crescimento tumoral induzida pela atividade física aeróbia. Por fim, Betof *et al.* (2015) também demonstraram que a atividade física aeróbia prévia foi capaz de atenuar o crescimento tumoral. O processo biológico estudado e envolvido nessa resposta estava

relacionado ao aumento da cobertura pericítica dos vasos tumorais, o qual gerou neo-angiogênese funcional dos vasos tumorais. Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa resposta não foram estudados e são pouco conhecidos. Tendo em vista que os TAMs apresentam um importante papel para a neo-vascularização, é possível sugerir que os efeitos da atividade física aeróbia sobre vascularização tumoral supracitados possam estar associados a uma melhora metabolismo dos TAMs envolvendo redução na expressão exacerbada de Redd1.

Como a atividade física aeróbia prévia é capaz de diminuir a incidência de diversos tipos de câncer, atenuar o crescimento tumoral e parece modular o sistema imune, na presente dissertação, utilizamos estratégias *in vivo* e *in silico* para explorar os possíveis efeitos da atividade física aeróbia prévia sobre a resposta imune antitumoral. Nesse sentido, testamos a hipótese de que a atividade física aeróbia seria capaz de modular a resposta imune antitumoral, mais especificamente dos TILs-T e dos TAMs em diferentes modelos de câncer em animais, tornando-a mais eficiente no combate a progressão da doença. Além disso, através de análise *in silico*, nós investigamos quais outros mecanismos relacionados a resposta imune antitumoral poderiam estar sendo modulados pela atividade física aeróbia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

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

Durante a progressão da doença, as células tumorais desenvolvem uma série de alterações biológicas importantes para sustentar a sua iniciação, proliferação, disseminação e resistência à morte conhecidas como *hallmarks* do câncer (HANAHAAN; WEINBERG, 2000, 2011). Hanahan e Weinberg (2000, 2011) discutem sobre 10 processos biológicos que podem

ser comuns entre as diferentes neoplasias, a saber: 1) sinalização de proliferação sustentada, 2) resistência a supressores de crescimento, 3) resistência à apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogênese sustentada, 6) invasão tecidual, 7) instabilidade do genoma celular, 8) inflamação, 9) reprogramação do metabolismo energético e 10) evasão da resposta anti-tumoral pelo sistema imune (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Embora Hanahan e Weinberg (2000, 2011) demonstrem alguns dos possíveis tratamentos para cada um dos *hallmarks* do câncer (Figura 1), a resposta dos pacientes aos diversos tratamentos ainda é imprevisível (PUSAPATI et al., 2016; QU et al., 2016), demonstrando a plasticidade das células tumorais (CHOI et al., 2014; LIM et al., 2014; LU et al., 2016; LUO et al., 2016; VAZQUEZ et al., 2013), o que favorece o câncer a ser a segunda principal causa de morte nos dias atuais (STEWART; WILD, 2014; TORRE et al., 2015). Diante disso, estratégias capazes de atenuar a iniciação, crescimento e agressividade tumoral são de fundamental importância para a diminuição da incidência e mortalidade provocada pela doença.

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

Nesse contexto, a imunoterapia surge como um tratamento promissor no combate à progressão tumoral (CHANG et al., 2015; GAO et al., 2017; GORDON et al., 2017; MANGUSO et al., 2017; VICTOR et al., 2015). O tratamento com os imunoterápicos anti-CTLA-4 e anti-PD-1 apresentam como principal mecanismo, o bloqueio dos receptores de *checkpoint* dos TILs-T, impedindo a inibição de sua função efetora induzida pelo microambiente tumoral (HAMID et al., 2013; HODI et al., 2010; TOPALIAN et al., 2012). Entretanto, apenas uma pequena parcela dos pacientes respondem de forma efetiva ao tratamento, sugerindo que a combinação com outras estratégias seja necessária para a melhor eficácia do tratamento (GAO et al., 2017; MANGUSO et al., 2017; VICTOR et al., 2015).

Embora sejam desconhecidos os mecanismos envolvidos na baixa resposta ao tratamento com imunoterapia, a disfunção metabólica dos TILs-T (BRAND et al., 2016; CHANG et al., 2015; PIETROCOLA et al., 2016; SCHARPING et al., 2016) e dos TAMs (CASAZZA et al., 2013; COLEGIO et al., 2014; GORDON et al., 2017; RIES et al., 2014; WENES et al., 2016) poderiam estar relacionados a essa resposta, haja vista que tais processos ocorrem no microambiente tumoral e parecem favorecer o desenvolvimento da doença.

Em relação aos TILs-T, Chang *et al.* (2015) demonstraram que no microambiente tumoral ocorre uma competição pelo substrato glicose entre os TILs-T e as células tumorais (CHANG et al., 2015). Quando as células tumorais apresentam menor capacidade glicolítica, os TILs-T consomem a glicose disponível aumentando a produção de interferon gama (IFN- γ) o que leva a atenuação ou regressão do crescimento tumoral (CHANG et al., 2015). Em contrapartida, a maior capacidade das células tumorais em consumir a glicose disponível no microambiente tumoral diminui a oferta desse nutriente para os TILs-T, gerando uma redução da capacidade citotóxica dos TILs-T o que favorece o crescimento tumoral (CHANG et al., 2015). O principal mecanismo envolvido nessa resposta seria que as células tumorais com alta capacidade glicolítica apresentam uma alta expressão de PD-L1 (do inglês *CD274 antigen*) o que promove o aumento da glicólise nas células tumorais (CHANG et al., 2015). A alta capacidade glicolítica das células tumorais não somente diminui a oferta de glicose para os TILs-T, mas também promove uma maior acidificação do meio tumoral (BRAND et al., 2016). Essa maior acidificação gerada pela liberação de lactato e prótons pelas células

tumorais contribui para a apoptose dos TILs-T e das células NK, além de reduzir a produção de citocinas antitumorais, tais como IFN- γ , pelos TILs-T e pelas células NK (BRAND et al., 2016). De fato, os efeitos da privação de glicose para os TILs-T no microambiente tumoral afetam o seu metabolismo glicolítico e, conseqüentemente, a sua função citotóxica.

A imunossupressão imposta pelo microambiente tumoral se estende ao metabolismo oxidativo dos TILs-T. Scharping *et al.* (2016) recentemente demonstraram que os TILs-T perdem conteúdo mitocondrial ao entrarem no microambiente tumoral (SCHARPING et al., 2016), sendo esta perda associada à redução de expressão de um importante regulador transcricional envolvido na biogênese mitocondrial, a PGC1- α (do inglês *peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha*) em virtude da ativação crônica (hiperfosforilação da serina 473) da Akt (do inglês *protein kinase B*) e conseqüente inibição de FoxO (do inglês *Forkhead box protein O*) que é um fator de transcrição que ativa PGC1- α . Como esperado, essa perda de conteúdo mitocondrial leva a disfunção citotóxica dos TILs-T.

Além do microambiente tumoral causar a disfunção metabólica dos TILs-T, as próprias células tumorais podem liberar citocinas que induzem a exaustão dos TILs-T como, por exemplo, PD-L1 (CHANG et al., 2015). O microambiente tumoral também pode induzir a maior atividade das Treg, culminando na exaustão dos TILs-T (TURNIS et al., 2016). Turnis *et al.* (2016) demonstraram que as Treg aumentam sua atividade ao adentrarem o microambiente tumoral, aumentando a produção e liberação de IL-35, uma citocina que promove a exaustão dos TILs-T por promover o aumento de múltiplos receptores inibitórios. Além disso, a maior atividade das Treg no microambiente tumoral aumenta o número de metástases pulmonares assim como debilita as células T de memória (TURNIS et al., 2016). Portanto, embora a imunoterapia seja direcionada a bloquear os receptores de *checkpoint* dos TILs-T como, por exemplo, CTLA-4 e PD-1, o microambiente tumoral gera uma série de alterações metabólicas nos TILs-T que são independentes dos mecanismos de exaustão provocados pelas citocinas liberadas pelas Treg ou pelas próprias células tumorais.

Para complementar a complexidade existente entre o tumor e o sistema imune, o tumor também pode provocar uma série de alterações sistêmicas que induzem a uma diminuição da resposta imune adaptativa e inata no microambiente tumoral. Flint *et al.* (2016) demonstraram que em modelos de caquexia do câncer, há aumento sistêmico de IL-6 induzido pela presença do tumor levando a uma diminuição da cetogênese hepática relacionada a uma redução dos níveis de mRNA de PPAR α (do inglês *peroxisome proliferator activated receptor alpha*) que

é um importante mediador da cetogênese no fígado. Essa redução na cetogênese é agravada pela deficiência calórica (anorexia) levando a uma resposta de aumento da secreção de glicocorticoides, hormônio do estresse que diminui a resposta imune adaptativa e inata no microambiente tumoral afetando a resposta dos animais à imunoterapia (FLINT et al., 2016). Em conjunto, os trabalhos acima mencionados demonstram as diferentes formas com que o tumor é capaz de debilitar o sistema imune, seja causando disfunção metabólica e aumentando a exaustão dos TILs-T e/ou gerando alterações sistêmicas que também debilitam a função das células imune.

Os macrófagos constituem uma população de células imunes que participam da resposta imune inata e, como já mencionado anteriormente, há uma disfunção dos TAMs no microambiente tumoral (CASAZZA et al., 2013; COLEGIO et al., 2014; WENES et al., 2016; ZHOU et al., 2015). Além da maior acidificação do meio tumoral prejudicar a função dos TILs-T e das células NK (BRAND et al., 2016), essa promove uma maior polarização dos TAMs para TAMs do tipo M2 (COLEGIO et al., 2014). Embora seja demonstrado que os TAMs de tipo M2 possam exercer um importante papel no crescimento tumoral pelo seu papel na neo-vascularização, principalmente em glioblastomas (ZHOU et al., 2015), esse papel pró-tumoral dos TAMs do tipo M2 parecem estar associados à disfunção metabólica induzida pelo microambiente tumoral. Recentemente, Wenes *et al.* demonstraram que nas regiões de hipóxia tumoral ocorre o aumento da expressão gênica de *Redd1* nos TAMs, debilitando o seu metabolismo glicolítico o que favorece a neo-vascularização disfuncional induzida pelo consumo exacerbado de glicose pelas células endoteliais tumorais (WENES et al., 2016). Interessantemente, quando é realizado a deleção de *Redd1* nos macrófagos dos animais injetados com diferentes linhagens celulares tumorais, os tumores apresentam um menor crescimento, os vasos tumorais tornam-se funcionais, diminui o número de metástases e aumenta a sobrevivência dos animais nos diferentes modelos de câncer estudados (WENES et al., 2016). Entretanto, os TAMs de tipo M2 apresentam um importante papel antitumoral quando o seu metabolismo glicolítico não é pelo microambiente tumoral.

Assim como os TILs-T, os TAMs de tipo M2 também podem expressar PD-1 e sofrer “exaustão” induzida pelo microambiente tumoral (GORDON et al., 2017). Gordon *et al.* (2017) demonstraram que durante o crescimento tumoral, os TAMs do tipo M2 diminuem a sua capacidade fagocitária pelo aumento gradual da expressão de PD-1 induzido pelo microambiente tumoral, favorecendo a progressão da doença. Embora o tratamento

combinado de anti-PD-1 com anti-CTLA-4 tenha a sua relevância clínica, essa estratégia pode causar efeitos colaterais severos como miocardite fulminante em pacientes com melanoma (JOHNSON et al., 2016). Portanto, semelhante ao que acontece com os TILs-T, o microambiente tumoral também possui a capacidade induzir a disfunção metabólica e “exaustão” dos TAMs.

Em conjunto, os mecanismos supracitados indicam alguns dos possíveis mecanismos que tornam a imunoterapia pouco eficiente, haja vista que o tumor induz não apenas a exaustão das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral, mas também induzem disfunção metabólica dessas células, limitando a sua função citotóxica. Diante disso, estratégias capazes de evitar a disfunção metabólica e exaustão dos TILs-T e dos TAMs são imprescindíveis para melhorar o prognóstico do paciente com câncer.

Em paralelo com a terapia farmacológica do câncer, sabe-se que a atividade física regular resulta em uma série de adaptações benéficas ao organismo, tendo como resposta fundamental a melhora da aptidão física (EGAN; ZIERATH, 2013). Entende-se por aptidão física, a capacidade de realizar tarefas diárias com vigor e estado de alerta, sem fadiga indevida e com energia para desfrutar de atividades de lazer e para atender emergências imprevistas (“World Health Organization - Physical activity”, 2017). A atividade física é um termo amplo que engloba tanto atividades estruturadas (exercício físico- com volume, intensidade e duração controlados) como não estruturadas (atividades recreacionais) (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

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

incluindo o câncer (FRIEDENREICH; CUST, 2008; KNOLS et al., 2005; MOORE et al., 2016; NEILSON et al., 2009; SCHMITZ et al., 2005; VOGEL, 2000).

No contexto do câncer, a literatura demonstra os benefícios da atividade física aeróbia para a diminuição do risco de incidência de alguns tipos de câncer (MOORE et al., 2016) bem como para a atenuação da crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em animal (BETOF et al., 2015; GOH et al., 2013; HIGGINS et al., 2014; HOJMAN et al., 2014; JU et al., 2008; MICHNA et al., 2006; ROEBUCK; MCCAFFREY; BAUMGARTNER, 1990; WOLFF et al., 2014). Moore *et al.* (2016) demonstraram que a prática regular de atividade física resultou na redução da incidência de 13 tipos de câncer em 26 analisados em 1,44 milhões de adultos (MOORE et al., 2016). De nota, aqueles indivíduos que realizaram maiores volumes diários de atividade física apresentaram redução na incidência dos seguintes cânceres: adenocarcinoma de esôfago, câncer de fígado, câncer de pulmão, câncer de rim, câncer de cardia gástrica, câncer endometrial, leucemia mielóide, mieloma, câncer de cólon, câncer de cabeça e pescoço, câncer de reto, câncer de bexiga e câncer de mama (MOORE et al., 2016). Importante ressaltar que os efeitos da atividade física na redução da incidência do câncer foi independente de outros fatores como, por exemplo, índice de massa corporal (IMC), fumo, região geográfica, uso de terapia hormonal e etnia (MOORE et al., 2016). Corroborando esses resultados, Pedersen *et al.* (2016) demonstraram que quatro semanas de atividade física voluntária prévia foi capaz de retardar a iniciação tumoral e reduzir o crescimento tumoral e diminuir a formação de nódulos metastáticos em vários modelos de câncer em camundongos (PEDERSEN et al., 2016). A atividade física aumentou a mobilização e redistribuição das células NK para o microambiente tumoral em resposta a um aumento de IL-6 e epinefrina circulantes induzidos agudamente pela atividade física aeróbia. Aumentos de IL-6 e epinefrina promoveram a mobilização e redistribuição das células NK⁺IL-6⁺ do baço para a circulação e, posteriormente, da circulação para o microambiente tumoral. Esse aumento de células NK no microambiente tumoral foi proposto como o principal mecanismo induzido pela atividade física aeróbia prévia para a atenuação do crescimento tumoral. Embora o estudo de Pedersen *et al.* seja um dos mais importantes a avaliar os efeitos da atividade física aeróbia prévia sobre o crescimento tumoral, não é possível afirmar que os mecanismos demonstrados sejam os únicos envolvidos nessa resposta. Nesse mesmo estudo foi observado atenuação do crescimento tumoral quando os animais realizaram apenas a atividade física aeróbia prévia, permanecendo sedentários a partir do

momento da inoculação das células tumorais. Esse resultado demonstra que mesmo sem os efeitos agudos da atividade física aeróbia para o aumento de IL-6 e epinefrina, também ocorre a redução do crescimento tumoral. Em relação a redução da formação de nódulos metastáticos, a estratégia utilizada para esse fenômeno, injeção das células via veia caudal, exclui diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da metástase como, por exemplo, formação de nicho pré-metastático (COSTA-SILVA et al., 2015; HOSHINO et al., 2015; KAPLAN et al., 2005; PEINADO et al., 2012), limitando o entendimento dos efeitos da atividade física sobre esse processo. Finalmente, também foi observado um alto aumento de TILs-T nos animais que realizaram atividade física aeróbia, sugerindo a participação dos TILs-T na atenuação do crescimento tumoral. Esses resultados demonstram que outros mecanismos podem estar envolvidos na atenuação do crescimento tumoral induzido pela atividade física aeróbia.

Resultados semelhantes foram encontrados por Betof *et al.* (2015), os quais também demonstraram que a atividade física aeróbia prévia foi capaz de atenuar o crescimento tumoral no modelo de câncer de mama 4T1. O mecanismo envolvido nessa resposta seria pelo aumento da cobertura pericítica dos vasos tumorais e aumento de apoptose no microambiente tumoral. De fato, a atividade física aeróbia prévia proporcionou uma maior neo-vascularização funcional em decorrência do aumento da cobertura pericítica sobre as células endoteliais tumorais, aumentando a densidade microvascular, maturidade vascular, além de diminuir as regiões de hipóxia no microambiente tumoral. Em conjunto, essas adaptações indicam que a atividade física aeróbia induz uma melhor função dos vasos tumorais, tornando a oferta de oxigênio, quimioterápico e nutriente mais efetiva o que poderia contribuir para a manutenção da resposta imune anti-tumoral no microambiente tumoral. Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa resposta não foram estudados e são pouco conhecidos. Tendo em vista que os TAMs apresentam um importante papel na neo-vascularização, é possível sugerir que a atividade física aeróbia possa estar atuando na vascularização tumoral via proteção do metabolismo dos TAMs.

Justificativa

Diante da importância da resposta imune antitumoral no combate ao desenvolvimento do câncer, estratégias capazes de tornar essa resposta mais eficiente permanecem como um grande desafio. A atividade física aeróbia demonstra-se como uma potente ferramenta no combate a progressão da doença, entretanto, os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda são pouco entendidos. Nesse sentido, nosso objetivo foi investigar os possíveis mecanismos envolvidos na resposta imune antitumoral frente a atividade física aeróbia prévia.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a contribuição da atividade física aeróbia a resposta imune antitumoral.

3.2 Específicos

I) determinar se um ambiente enriquecido com uma roda de atividade física voluntária é um bom modelo para aumentar a capacidade física aeróbia em camundongos saudáveis.

II) avaliar os efeitos atividade física aeróbia prévia sobre a iniciação, crescimento e agressividade tumoral em camundongos que receberam injeção com as células tumorais do câncer de cólon 26 (CT26), do melanoma B16F10 (B16), do câncer de mama 4T1 (4T1) e do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC).

III) avaliar se a atividade física aeróbia prévia influencia a sobrevida de camundongos que receberam injeção com as células tumorais do melanoma B16.

IV) explorar os mecanismos envolvidos em uma possível melhora da resposta imune antitumoral com a atividade física aeróbia.

Esse projeto foi dividido em três estudos.

Caracterização do modelo de atividade física espontânea diária

Primeiramente, nós buscamos caracterizar em nosso laboratório o protocolo de atividade física aeróbia voluntária a ser realizado pelos animais. Para tal padronização, testamos se a exposição diária de camundongos a um ambiente contendo roda de atividade física voluntária seria um bom modelo para aumentar a capacidade física aeróbia. Em uma segunda etapa, observamos, o tempo necessário para se atingir o *plateau* da capacidade física aeróbia com a atividade física voluntária.

Para esse estudo, os camundongos foram aleatorizados para compor dois grupos experimentais: 1) sedentários (SED) ou 2) submetidos ao ambiente enriquecido com roda de atividade física voluntária (Wheel Running). Dois dias antes dos animais do grupo Wheel

Running serem expostos ao ambiente contendo a roda de atividade física voluntária, e a cada 30 dias, os animais do grupo SED e Wheel Running foram submetidos a um teste progressivo até a exaustão para determinar o seu desempenho físico. O momento no qual o desempenho físico no teste progressivo não se alterou entre as avaliações, foi considerado o momento no qual a capacidade física alcançou o seu *plateau*.

A Figura 2 representa o desenho experimental desse estudo.

Figura 2. Desenho experimental da caracterização do modelo de atividade física espontânea diária

ESTUDO I: Efeitos da atividade física aeróbia sobre o crescimento tumoral

Esse primeiro estudo teve como objetivo responder à seguinte pergunta: A atividade física aeróbia prévia é capaz de retardar a iniciação tumoral e atenuar o crescimento e agressividade tumoral em camundongos inoculados com as células tumorais CT26, 4T1, B16 e LLC? Além disso, investigamos se a atividade física aeróbia prévia poderia modular a resposta dos TILs-T e dos TAMs.

Para esse estudo, os animais realizaram dois tipos diferentes de atividade física. Os modelos de câncer B16 e LLC foram pré-condicionados em roda de atividade física aeróbia voluntária durante 45 dias. Já para os modelos CT26 e 4T1, os animais foram pré-condicionados em esteira rolante durante 30 dias. Após o período de pré-condicionamento, os animais foram injetados com as respectivas células tumorais. Todos os animais mantiveram suas respectivas atividades físicas após a inoculação das células tumorais, além de serem avaliados diariamente para identificar o momento de surgimento do tumor e mensuração do

volume tumoral. No momento do sacrifício a massa do tumor, do fígado, do pulmão e do baço foi cuidadosamente aferida e os tecidos foram preparados para as análises histológicas e congelados para as análises bioquímicas. Por fim, foi realizada a análise de expressão gênica de marcadores relacionado aos TILs-T e TAMs.

A Figura 3 representa o desenho experimental desse estudo.

Figura 3. Desenho experimental do ESTUDO I.

ESTUDO II: Impacto da atividade física aeróbia prévia sobre a sobrevida de camundongos com câncer.

Esse segundo estudo teve como objetivo responder à seguinte pergunta: a atividade física aeróbia prévia é capaz de aumentar a sobrevida de animais inoculados com as células tumorais do melanoma B16?

Para esse estudo, os animais foram pré-condicionados em roda de atividade física aeróbia voluntária aeróbia durante 90 dias. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: 1) *Wheel Running*+B16 e 2) SED+B16. A sobrevida foi acompanhada ao longo de 50 dias. Após 50 dias, os animais que sobreviveram foram sacrificados em virtude

da magnitude do volume tumoral seguindo recomendações das diretrizes para o bem-estar do uso de animais na pesquisa do câncer (WORKMAN et al., 2010).

A Figura 4 ilustra ambos os experimentos.

Figura 4. Desenho experimental do ESTUDO II.

ESTUDO III: Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral

O terceiro estudo teve como objetivo explorar os possíveis mecanismos envolvidos em uma melhora da resposta imune antitumoral com a atividade física aeróbia prévia.

Através de dados públicos predefinidos de expressão gênica (*Gene set enrichment analysis* - GSEA), nós determinamos se atividade física aeróbia prévia poderia gerar assinaturas imunológicas tumorais semelhantes aos pacientes com diferentes tipos de câncer que apresentaram maior sobrevida. Além disso, o GSEA também foi utilizado para determinar se a atividade física aeróbia prévia poderia gerar assinaturas imunológicas tumorais semelhante aos animais sensíveis ao tratamento com anti-CTLA-4 (*Ipilimumab*) e aos pacientes com câncer de próstata pós tratamento com anti-CTLA-4.

4 MÉTODOS

4.1 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo aprovou esse projeto de pesquisa (2014/08, ver anexo 1). Para realização desse projeto também foram utilizadas amostras de projetos de pesquisa aprovados pelo CEUA (2015/03 e 115/16, ver anexo 1). Além disso, esse trabalho segue os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Animais

A amostra desse projeto foi composta por camundongos machos da linhagem C57BL/6 e camundongos fêmeas da linhagem Balb/c com idades entre 8 e 12 semanas. Os animais foram alocados no biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas plásticas (um animal por caixa para a linhagem C57BL/6 e 4 animais por caixa para a linhagem Balb/c), a uma temperatura ambiente de 22° a 24° C e em ciclo de 12 horas (claro:escuro invertido). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*, sendo a ração normoproteica (12% de proteínas).

4.3 Protocolo de atividade física voluntária

A atividade física voluntária foi realizada em roda de atividade pelos animais da linhagem C57BL6 durante 60 dias (45 dias antes da inoculação das células tumorais + 15 dias após a inoculação das células tumorais). Os animais ficaram em gaiolas individuais, com dimensões de 40cm de comprimento, 32cm de largura e 16cm de altura, equipadas com uma roda de atividade para pequenos animais, à qual tiveram livre acesso (Silent Spinner, Kaytee). Esta roda teve curso livre e a atividade dos animais foi avaliada através de um conta-giros eletrônico instalado no eixo da mesma. O conta-giros estava conectado a um sistema de registro automatizado, desenvolvido especificamente para esse fim, o qual computou o volume da atividade física dos animais durante 24 horas.

4.4 Protocolo de atividade física estruturada (treinamento físico)

O treinamento físico foi realizado segundo o protocolo desenvolvido por Ferreira e seus colaboradores em sistema de esteira (FERREIRA et al., 2007). O treinamento físico teve duração de 45 dias para os animais da linhagem Balb/c (30 dias antes da inoculação das células tumorais + 15 dias após a inoculação das células tumorais). Todos os animais realizaram 5 sessões semanais com aumento progressivo do tempo, chegando a 60 minutos, e aumento progressivo de sobrecarga de trabalho, chegando a 60% da velocidade máxima conseguida no teste de exaustão que corresponde a intensidade de máxima fase estável de lactato. Esse trabalho é caracterizado como de moderada intensidade com predomínio de metabolismo aeróbio.

4.5 Cultura de células tumorais

As células tumorais do melanoma B16, CT26 e 4T1 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Roger Chammas do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo da Universidade de São Paulo (ICESP – USP) enquanto que as células do carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jorge Lira Ruas, do *Department of Physiology and Pharmacology* do *Karoliska Institutet*. As células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

Para todas as linhagens tumorais, foram inoculadas, aproximadamente, 2×10^6 células na região subcutânea do flanco superior direito dos camundongos. Os animais da linhagem C57BL6 foram inoculados com as células tumorais B16 e LLC enquanto que os animais da linhagem Balb/c foram inoculados com as células tumorais CT26 ou 4T1.

4.6 Crescimento tumoral e massa corporal

A avaliação do crescimento tumoral foi realizada a cada dois dias após a inoculação das células tumorais utilizando um paquímetro. Foram mensurados o maior e o menor diâmetro do tumor de acordo com o descrito por Bergers *et al.*, 2003 (BERGERS et al., 2003)

Os valores obtidos foram utilizados na fórmula a seguir para estimativa do volume tumoral: $V = 0,52 \times (\text{maior diâmetro}) \times (\text{menor diâmetro})^2$.

A massa corporal foi aferida a cada dois dias na parte da manhã (início do ciclo escuro dos animais) em balança digital (Gehaka, Brasil). Para estimar a massa corporal livre de tumor, a massa tumoral foi subtraída da massa corporal final.

4.7 Método de sacrifício

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

4.8 Expressão gênica

A expressão dos genes de interesse foi avaliada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) para os tumores B16 (a extração de RNA dos tumores B16 com TRIzol não foi eficiente) e TRIzol (Thermo Scientific) para os tumores CT26 e 4T1. As concentrações e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich). A transcrição reversa do RNA (síntese de cDNA) foi realizada utilizando High-Capacity RNA-to-cDNATM Kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR (Viia7 Real-Time PCR system, Applied Biosystems) utilizando primers específicos e Power SYBR® Green Master Mix (Thermo Scientific). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) como descrito pelo produtor do sistema. Os primers específicos de cada gene foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Como genes normalizadores, foram utilizados a ciclofilina e TBP para os tumores B16 e CT26 e Hprt, ciclofilina e B2M para os tumores 4T1.

4.9 Gene set enrichment analysis (GSEA)

Nós utilizamos o *gene set enrichment analysis* (GSEA, Broad Institute) (SUBRAMANIAN et al., 2005) para comparar as assinaturas imunológicas em tumores primários de pacientes e animais. Para isso, foram utilizados os dados de expressão gênica de 13 estudos com pacientes com câncer (para maiores detalhes ver item 4.10). Para cada estudo, nós determinamos 2 grupos experimentais: 1) “Vivo” e 2) “Morto”. Nós incluímos no grupo “Vivo” somente os pacientes que permaneceram vivos até o momento da última atualização de cada um dos estudos, enquanto que o grupo “Morto” foi composto pelos pacientes identificados como mortos em decorrência da doença até a última atualização de cada um dos estudos. Nós excluimos das análises de GSEA aqueles pacientes que não apresentavam a informação sobre o status de sobrevivência e também aqueles pacientes que morreram em decorrência de causas desconhecidas.

A análise de expressão gênica diferencial com o GSEA entre os pacientes do grupo “Vivo” vs “Morto” foi realizada como descrito a seguir. O GSEA de *Immunologic Signatures*, composta por 4872 *gene sets*, foi realizado para os 13 estudos selecionados. Os *gene sets* foram obtidos da coleção de “IMMUNOLOGIC SIGNATURES” do MSigD, encontrado em <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>.

Os resultados gerados pelo GSEA são dados por score de enriquecimento (do inglês *enrichment score* - ES), por um score de enriquecimento normalizado (do inglês *normalized enrichment score* - NES) que demonstra o tamanho do conjunto de genes testados, por um valor de p, e por um *False Discovery Rate* (FDR). Nós computamos o valor de P usando 1000 permutações para cada fenótipo e corrigimos pelo método de *False Discovery Rate* (FDR). Nós consideramos enriquecidas aquelas assinaturas imunológicas que apresentassem um FDR menor que 0,25.

A mesma abordagem foi utilizada para determinar a assinatura imunológica em tumores primários de camundongos que realizaram atividade física aeróbia prévia (GSE62628). Para essa análise, nós determinamos 2 grupos experimentais: 1) “Exer” (animais que realizaram atividade física aeróbia prévia) e 2) “SED” (animais que permaneceram sedentários durante todo o segmento). Foi analisada a expressão gênica diferencial com o GSEA entre os animais “Exer” vs “SED”. Nós computamos o valor de P usando 1000 permutações para cada gene set e corrigimos pelo método de FDR.

Por fim, nós também determinamos assinatura imunológica em tumores primários de melanoma de camundongos responsivos ao tratamento com o imunoterápico anti-CTLA-4

(GSE65503-GLP16570) e de tumores primários de pacientes com câncer de próstata pós tratamento com anti-CTLA-4 (GSE77910). Para o estudo com camundongos, nós determinamos 2 grupos experimentais: 1) “Responsivos” (animais que foram responsivos ao tratamento com anti-CTLA-4) e 2) “Não responsivos” (animais que não responderam ao tratamento com anti-CTLA-4). Já para o estudo com pacientes, nós determinamos 2 grupos experimentais: 1) “Pós anti-CTLA-4” e 2) “Pré anti-CTLA-4”. Foi analisada a expressão gênica diferencial com o GSEA entre os animais “Responsivos” vs “Não responsivos” e entre os pacientes “Pós anti-CTLA-4” vs “Pré anti-CTLA-4”. Nós computamos o valor de P usando 1000 permutações para cada *gene set* e corrigimos pelo método de FDR.

4.10. GSE utilizados

Para as análises de GSEA, nós baixamos os dados de *microarray* através do *Gene Expression Omnibus* (GEO). Abaixo, seguem os GSEs de cada um dos dados de *microarray* utilizados nesse estudo.

Pacientes:

- Câncer de mama (“Vivo” vs “Morto”): GSE1456-GLP96. Pawitan *et al.*, 2015 (PAWITAN *et al.*, 2005)
- Mieloma (“Vivo” vs “Morto”): GSE2658. Publishing Nature, 2006 (HANAMURA *et al.*, 2006)
- Câncer de pulmão (“Vivo” vs “Morto”): GSE3141. Bild *et al.*, 2006 (BILD *et al.*, 2006)
- Glioblastoma (“Vivo” vs “Morto”): GSE7696. Murat *et al.*, 2008 (MURAT *et al.*, 2017)
- Câncer de colon (“Vivo” vs “Morto”): GSE17538-GPL570. Smith *et al.*, 2010 (SMITH *et al.*, 2010)
- Edwing sarcoma (“Vivo” vs “Morto”): GSE17679. Savola *et al.*, 2011 (SAVOLA *et al.*, 2011)
- Melanoma (“Vivo” vs “Morto”): GSE19234. Bogunovic *et al.*, 2009 (BOGUNOVIC *et al.*, 2009)
- Glioma (“Vivo” vs “Morto”): GSE43378. Kawaguchi *et al.*, 2013 (KAWAGUCHI *et al.*, 2013)

- Linfoma (“Vivo” vs “Morto”): GSE58445. Iqbal *et al.*, 2013 (IQBAL *et al.*, 2014)
- Pâncreas (“Vivo” vs “Morto”): GSE62452. Yang *et al.*, 2016 (YANG *et al.*, 2016)
- Bexiga (“Vivo” vs “Morto”): GSE32894. Sjodah *et al.*, 2012 (LAUSS; KRISTINA, 2012)
- Linfoma de células B (“Vivo” vs “Morto”): GSE10846. Lenz *et al.*, 2008 (LENZ *et al.*, 2008)
- Ovário (“Vivo” vs “Morto”): GSE63885. Lisowska *et al.*, 2014 (LISOWSKA *et al.*, 2014)
- Câncer de próstata - anti-CTLA-4 (“Pré vs Pós): GSE77910. Gao *et al.*, 2017 (GAO *et al.*, 2017)

Animais:

- Melanoma B16F10 (“Exer vs SED”): GSE62628. Pedersen *et al.*, 2016 (PEDERSEN *et al.*, 2016)
- Melanoma B16F10 - anti-CTLA-4 (“Responsivo vs Não Responsivo”): GSE65503-GLP16570. Victor *et al.*, 2015 (VICTOR *et al.*, 2015)

Células:

- Células tumorais do câncer de mama MDA-MB-231 (“SED vs Treinada”): GSE46925. Dados não publicados.

4.11 Análise de sobrevida

A curva de Kaplan Meier para a sobrevida global dos pacientes com câncer foi gerada com a análise de *microarray* e visualizada pela plataforma R2 (<http://r2.amc.nl>) usando os seguintes *datasets*: “R2: Tumor Melanoma Metastatic – Bhardwaj – 44 – fRMA – u133p2”, “R2: Tumor Breast – Bergh – 159 – MAS5.0 – u133”, “R2: Tumor Lymphoma (T-cell Peripheral) – Rosenwald – 193 – MAS5.0 – u133p2” e “R2: Tumor Ovarian – Pamula-Pilat – 101 – MAS5.0 – u133p2”.

4.12 Diagrama de Venn

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

4.13 Análise Estatística

Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste de Grubbs para identificação dos *outliers*. Conforme o desenho experimental, foi aplicado teste *t*-Student bicaudal para amostras não-pareadas ou análise de variância (ANOVA) para um ou dois caminhos. No caso de interação significativa na ANOVA, foi aplicado o teste post-hoc de Bonferroni. Para as análises de correlação foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson. Para a avaliação da sobrevida e primeira identificação tumoral, foi utilizado o teste de Log-rank. As associações entre duas variáveis foram testadas pela correlação de Pearson e o valor de r^2 foi reportado. O nível de significância adotado nesse estudo foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1: Caracterização do modelo de atividade física espontânea diária

Achados clínicos indicam que pacientes com câncer que possuem uma capacidade física reduzida, apresentam um pior prognóstico (CRAMER et al., 2014; JONES et al., 2012; KOELWYN; JONES; MOSLEHI, 2014). Por exemplo, indivíduos com câncer colorretal apresentam uma redução superior a 20% no consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ máx.) quando comparados aos seus pares saudáveis (CRAMER et al., 2014). Lakoski *et al.* (2015) demonstram que pacientes com câncer de pulmão e câncer colorretal com maior capacidade física apresentam uma maior sobrevida em comparação aos pacientes com menor capacidade física (LAKOSKI et al., 2015)

Com o intuito de caracterizar um protocolo para melhorar a aptidão física voluntária, nós verificamos se a roda de atividade física voluntária aeróbia (*Wheel Running*) seria capaz de aumentar a capacidade física aeróbia em animais. Portanto, em um primeiro momento, comparamos o desempenho físico dos animais no teste progressivo máximo (distância total percorrida e velocidade máxima atingida) e na roda de atividade (média da distância diária percorrida). Assim, quando avaliado o desempenho dos animais no teste progressivo máximo, tanto para a velocidade máxima atingida no teste quanto para a distância total percorrida (Figura 5A e 5B), observou-se que os animais do grupo *Wheel Running* apresentaram um aumento significativo em sua capacidade física aeróbia logo nos primeiros 30 dias de exposição ao ambiente enriquecido com roda de atividade e que esse desempenho se manteve ao longo do período de 120 dias (60, 90 e 120 dias). Esses resultados assemelham-se muito aos resultados encontrados na literatura (FLYNN et al., 2010; HØYDAL et al., 2007; KEMI et al., 2002; LAMBERT et al., 1996; LUND et al., 2015; MARCALETTI; THOMAS; FEIGE, 2011; MARCELIN et al., 2012; MAXWELL et al., 2001; MILLE-HAMARD et al., 2015; SCHEFER; TALAN, 1996; SCHIPPERS; LEMOINE; MCCLELLAND, 2014; SPEAKMAN, 2013; SWALLOW et al., 1998; WOJEWODA et al., 2014). Vale ressaltar que em estudo prévio do nosso grupo, observamos uma correlação positiva e significativa entre o $\dot{V}O_2$ máx. e o desempenho físico em teste progressivo máximo em camundongos, o que sugere que a atividade física voluntária melhora a aptidão aeróbia dos animais (FERREIRA et al., 2007).

O desempenho físico também aumentou significativamente nos camundongos expostos à roda de atividade física aeróbica voluntária. Como pode ser observado na Figura 5C, os animais aumentaram gradualmente a distância diária percorrida até o trigésimo dia, momento no qual a distância diária percorrida pelos animais se estabilizou e manteve-se constante até o centésimo vigésimo dia (Figura 5C). Por fim, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos para a massa corporal, a qual foi observada apenas um efeito significativo de tempo, ou seja, os animais de ambos os grupos aumentaram a massa corporal gradualmente com o passar do tempo (Figura 5D).

Figura 5: Desempenho entre os grupos Wheel Running e SED. A: velocidade máxima atingida no teste progressivo máximo. B: distância total percorrida no teste progressivo máximo. C: média da distância diária percorrida na roda de atividade física voluntária durante 120 dias. D: massa corporal. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de dois fatores, seguida de pos hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Na sequência, procuramos entender se os animais que percorriam uma maior distância diária também seriam os que apresentavam os maiores aumentos de desempenho no teste progressivo máximo. Entretanto, a Figura 6 mostra que não existe correlação significativa entre a distância diária percorrida e o delta da velocidade máxima atingida entre uma sessão e outra do teste progressivo máximo. Portanto, esses resultados sugerem que, para os nossos animais, percorrer um quilômetro diário é suficiente para aumentar consideravelmente o desempenho no teste progressivo máximo e que maiores distâncias diárias não proporcionam melhoras adicionais da capacidade física aeróbia. Com isso, foi possível estabelecer qual a distância diária mínima percorrida na roda de atividade física voluntária aeróbia necessária para promover um aumento considerável no desempenho durante o teste progressivo máximo.

Figura 6: Correlação do delta da distância e da velocidade máxima atingida no teste progressivo máximo com a média do volume diário percorrido na roda de atividade física

voluntária nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias. Para a análise estatística foi realizada a correlação de Pearson.

5.2 ESTUDO I - Efeitos da atividade física aeróbia sobre o crescimento tumoral

A literatura demonstra que a atividade física aeróbia prévia é capaz de atenuar o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em animais (BETOF et al., 2015; GOH et al., 2013; HIGGINS et al., 2014; HOJMAN et al., 2014; JU et al., 2008; MICHNA et al., 2006; ROEBUCK; MCCAFFREY; BAUMGARTNER, 1990; WOLFF et al., 2014). Desse modo, buscamos avaliar se, de fato, a atividade física aeróbia prévia seria capaz de atenuar o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em camundongos.

Nós injetamos as células tumorais B16 e LLC nos animais que realizaram atividade física voluntária prévia em roda de atividade. A figura 7 mostra que os animais dos grupos Wheel Running+B16 (Figura 7A) e do grupo Wheel Running+LLC (Figura 7B) apresentaram uma atenuação do crescimento tumoral quando analisado o curso temporal *in vivo* (painel à esquerda) e quando analisado o volume tumoral extirpado, *ex vivo* (painel à direita).

Muitos dos estudos que avaliaram os efeitos da atividade física aeróbia sobre o crescimento tumoral utilizaram a roda de atividade física voluntária aeróbia como estratégia (BETOF et al., 2015; GOH et al., 2013; HIGGINS et al., 2014; HOJMAN et al., 2014; JU et al., 2008; MICHNA et al., 2006; ROEBUCK; MCCAFFREY; BAUMGARTNER, 1990; WOLFF et al., 2014), sendo poucos os estudos que utilizaram como estratégia a atividade o treinamento físico aeróbio forçado em esteira rolante com controle de intensidade, frequência e volume de treino (PIN et al., 2015). Embora a atividade física realizada na roda de atividade física voluntária não tenha controle de intensidade, volume e frequência, essa estratégia é vantajosa, pois gera menos estresse aos animais. Esse menor estresse gerado é um fator importante a ser considerado durante o crescimento tumoral. Além disso, o volume diário percorrido pelos animais na roda de atividade é mais que o dobro da distância percorrida em uma sessão de treinamento físico aeróbio em esteira, além da magnitude de aumento no teste progressivo máximo ser semelhante entre os animais que realizam atividade física em roda de atividade voluntária e os animais que realizam atividade física aeróbia em esteira rolante. Contudo, as adaptações agudas e crônicas promovidas pela atividade física aeróbia ocorrem

em um menor intervalado de tempo quando essa é realizada controlando-se o volume, a intensidade e a frequência. Diante disso, nós também avaliamos se o treinamento físico aeróbio prévio em esteira poderia atenuar o crescimento tumoral.

Nós injetamos as células tumorais CT26 e 4T1 nos animais que realizaram treinamento físico aeróbio prévio. A figura 7C mostra que os animais dos grupos TREINADO+CT26 também apresentaram uma atenuação do crescimento tumoral. Embora não tenha sido observado alteração no volume tumoral para os modelos de câncer de mama 4T1 (Figura 7D), esse fato pode ser explicado pelo reduzido número de animais que conseguimos incluir no estudo. Betof *et al.* (2015) demonstraram que 30 dias de atividade física voluntária prévia foi capaz de diminuir o volume tumoral dos animais injetados com as células tumorais do câncer de mama 4T1 (BETOF et al., 2015). Entretanto, no estudo de Betof *et al.* (2015) foi utilizado o dobro de animais utilizados no nosso estudo (BETOF et al., 2015).

Resultados semelhantes também foram encontrados pelo estudo de Pedersen *et al.* (2016), onde 30 dias de atividade física voluntária prévia foi eficiente em diminuir o volume tumoral no modelo de câncer B16 e LLC (PEDERSEN et al., 2016). Importante salientar que a redução do volume tumoral foi observada tanto para camundongos machos da linhagem C57BL6 que realizaram atividade física aeróbia voluntária prévia (B16 e LLC) quanto para camundongos fêmeas da linhagem Balb/C que realizaram treinamento aeróbio prévio em esteira rolante (CT26), sugerindo que os efeitos benéficos da atividade física aeróbia podem ser independentes de gênero e tipo de atividade física aeróbia (não estruturada e estruturada).

Figura 7: Efeitos da atividade física aeróbia sobre o crescimento tumoral. A-D: Volume tumoral durante o curso temporal e volume tumoral ex-vivo mensurado no momento do sacrifício dos animais para os modelos de câncer B16, LLC, CT26 e 4T1. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de dois fatores e teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Tendo em vista que a atividade física aeróbia foi eficiente em reduzir o volume tumoral nos modelos de câncer B16, LLC e CT26, nosso próximo passo foi verificar se também poderia ocorrer um retardo na iniciação tumoral nos modelos de câncer utilizados. Para isso, os animais foram apalpados diariamente para que o momento da primeira

identificação do tumor fosse determinado. Como é mostrado na Figura 8, apenas para o modelo B16 foi observado um retardo na iniciação tumoral, sendo que após 6 dias da injeção das células tumorais, 50% dos animais do grupo Wheel Running+B16 apresentavam tumor ao passo que 87,5% dos animais do grupo SED+B16 já apresentavam tumor para o mesmo período (Figura 8A). Esse resultado sugere que a atividade física aeróbia prévia retarda a iniciação tumoral do tumor B16 por mecanismo desconhecidos. Por fim, para os modelos LLC, CT26 e 4T1 não foi observado nenhuma alteração na iniciação tumoral (Figura 8B-8D).

Figura 8: Efeitos da atividade física aeróbica sobre a iniciação tumoral (1ª identificação tumoral). A-C: Porcentagem de animais sem tumor e porcentagem de animais com tumor após a inoculação das células tumorais B16, LLC, CT26 e 4T1.

Levando em consideração a importância da imunidade sistêmica para resposta imune antitumoral contra a progressão da doença (SPITZER et al., 2017), nós analisamos se a atividade física aeróbica prévia poderia atenuar o aumento da massa do baço causado pela presença do tumor, uma vez que o baço é um órgão que possui um papel importante para a resposta imunológica do organismo (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2017). Como pode ser

observado na Figuras 9, os modelos de câncer LLC, CT26 (Figura 9A) e 4T1 (Figura 9B) apresentaram um aumento significativo da massa do baço, o que não foi observado para o modelo B16. Além disso, os animais dos grupos Wheel Running+LLC e Treinado+CT26, apresentam uma atenuação no aumento da massa do baço, enquanto que para o grupo Treinado+4T1 não observada resposta significativa ($p=0,1$). Assim, é possível sugerir que esses resultados possam estar associados com os possíveis efeitos da atividade física aeróbia sobre a atenuação do crescimento tumoral.

Em conjunto, esses resultados demonstram que atividade física aeróbia é capaz de atenuar o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em camundongos independentemente de gênero, linhagem, tipo de atividade física aeróbia (não estruturada e estruturada) e tempo para a iniciação tumoral, e que esses resultados podem estar associados à uma atenuação do aumento da massa do baço.

Figura 9: Efeitos da atividade física aeróbia sobre a massa baço. A: Massa do baço dos animais C57BL/6 machos que realizaram atividade física aeróbia voluntária prévia e foram injetados com as células tumorais do melanoma B16 e LLC. B: Massa do baço dos animais Balb/c fêmeas que realizaram treinamento físico aeróbio prévia e foram injetados com as células tumorais do melanoma CT26 e 4T1. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado ANOVA de dois fatores seguida de *pos hoc* de Bonferroni e teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.2.1 Efeitos da atividade física aeróbia sobre a resposta dos TILs-T e dos TAMs

Como a atividade física aeróbia foi eficiente em atenuar o crescimento tumoral e o aumento da massa do baço, nós nos perguntamos se esses resultados não poderiam estar associados à uma alteração da resposta imune antitumoral de marcadores de TILs-T e de TAMs. A literatura demonstra a importância da manutenção da resposta imune antitumoral para a atenuação da progressão da doença. A exaustão e disfunção dos TILs-T (BRAND et al., 2016; CHANG et al., 2015; PIETROCOLA et al., 2016; SCHARPING et al., 2016) e disfunção metabólica dos TAMs (CASAZZA et al., 2013; COLEGIO et al., 2014; GORDON et al., 2017; RIES et al., 2014; WENES et al., 2016) são processos que ocorrem no microambiente tumoral e parecem favorecer o desenvolvimento da doença. Aqui, nós avaliamos em 3 modelos diferentes de câncer se atividade física aeróbia prévia poderia modular a expressão gênica de marcadores já bem caracterizados relacionados aos TILs-T e aos TAMs. Assim, na Figura 10A é mostrado que para o modelo de câncer B16, a atividade física aeróbia reduziu os níveis de mRNA de PD-1 e CD4, além de aumentar a expressão de Fizz1 (do inglês *resistin like alpha*) e Mgl1 (do inglês *C-type lectin domain family 10, member A*) e não modificou os níveis de mRNA de CD8 e IFN- γ . PD-1 possui um importante papel no *checkpoint* dos TILs-T CD8⁺ e dos TAMs. No microambiente tumoral, tanto as células tumorais quanto as células T CD4⁺FOXP3⁺ regulatórias podem liberar PD-L1, a qual se ligará a PD-1 para induzir o *checkpoint* dos TILs-T CD8⁺ (CHANG et al., 2015) e dos TAMs (GORDON et al., 2017). Embora não tenha sido observado aumento nos níveis de mRNA de CD8 e IFN- γ , o aumento de Fizz1 e Mgl1, dois marcadores de macrófagos do tipo M2, podem estar relacionados com a resposta imune antitumoral em decorrência da atividade física aeróbia. Os TAMs do tipo M2 são descritos por apresentarem um forte papel pró-tumoral (CASAZZA et al., 2013; COLEGIO et al., 2014; ZHOU et al., 2015), principalmente pela sua capacidade de gerar neo-vascularização. Entretanto, a literatura recente tem demonstrado que esse papel pró-tumoral ocorre em virtude do aumento progressivo da expressão de PD-1 nos TAMs de tipo M2 com o avanço da doença (GORDON et al., 2017). Além disso, o microambiente tumoral pode induzir o aumento de Redd1 nos TAMs de tipo M2, diminuindo a eficiência do seu metabolismo glicolítico, promovendo o consumo excessivo de glicose pelas células endoteliais tumorais o que proporciona o seu crescimento

disfuncional (WENES et al., 2016). Entretanto, os TAMs de tipo M2 podem apresentar um papel antitumoral quando seu metabolismo glicolítico é preservado bem como impedindo o aumento da expressão de PD-1 durante o crescimento tumoral. Embora não tenha sido observado alteração na expressão gênica de *Redd1* e também não tenha sido analisado a capacidade fagocitária dos TAMs de tipo M2, o aumento da expressão gênica de marcadores de macrófagos M2 induzidos pela atividade física aeróbia observados no modelo B16 poderiam estar associados com a preservação do metabolismo glicolítico e capacidade fagocitária dos TAMs de tipo M2. Já na Figura 10B é mostrado que os animais com câncer de colón CT26 que realizaram treinamento físico aeróbio prévio apresentaram redução na expressão gênica de CD4, CD163, *Fizz1*, *Vegfa* (do inglês *vascular endothelial growth factor α*), *Glut1* (do inglês *solute carrier family 2 -facilitated glucose transporter-, member 1*) e *Hif1α* (do inglês *hypoxia inducible factor 1 alpha subunit*). Embora não tenha sido observado aumento da expressão gênica de CD8 e TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor α*), novamente foi observado uma menor expressão gênica de CD4 nos tumores dos animais treinados em comparação com os animais sedentários. Além disso, a resposta de marcadores de TAMs de tipo M2 nos tumores CT26 frente a atividade física aeróbia parece ser distinta da observada nos tumores B16. Nos tumores CT26, nós observamos uma diminuição na expressão gênica de CD163 e *Fizz1* acompanhado de uma diminuição de *Vegfa*, *Glut1* e *Hif1α*. As regiões de hipóxia tumoral apresentam uma alta expressão de *Hif1α* (CASAZZA et al., 2013; COLEGIO et al., 2014) e os TAMs de tipo M2 presentes nessas regiões apresentam uma alta expressão de expressão de *Glut1* (WENES et al., 2016; ZHOU et al., 2015). Esses resultados sugerem que a diminuição dos marcadores de TAMs pela atividade física aeróbia pode estar associada à uma diminuição das regiões de hipóxia tumoral e, talvez, uma diminuição da vascularização tumoral disfuncional. Por fim, na Figura 10C é mostrado os resultados de expressão gênica para o modelo de câncer de mama 4T1. Interessantemente, nós encontramos que o treinamento físico aeróbio diminuiu a expressão gênica de CD8, CD11c (do inglês *integrin subunit alpha X*) e TNF- α nos tumores desses animais mesmo com a diminuição da expressão gênica de PD-L1 e Lag3 (do inglês *lymphocyte activating 3*). Semelhante a função de PD-1, Lag3 também possui um papel importante no *checkpoint* dos TILs-T (SCHARPING et al., 2016). Nós esperávamos que com a diminuição da expressão gênica de PD-L1 e Lag3 seria observado um aumento de marcadores relacionados a função dos TILs-T através do aumento da expressão gênica de IFN- γ e TNF- α nos tumores, entretanto, essa resposta não foi

observada. Além disso, nós observamos uma redução na expressão de *Redd1*, sugerindo uma possível melhora do metabolismo glicolítico dos TAMs de tipo M2 ou uma possível diminuição das regiões de hipóxia tumoral, haja vista que o aumento da expressão de *Redd1* ocorre em condições de hipóxia (WENES et al., 2016).

Aqui, esses resultados sugerem duas hipóteses possíveis para os efeitos da atividade física aeróbia sobre a alteração de marcadores de TILs-T e de TAMs. Uma das hipóteses seria que a atividade física aeróbia reduz a expressão de marcadores de *checkpoint* e melhora o metabolismo dos TAMs por mecanismos que são tumor-específico. A outra hipótese estaria relacionada ao tempo de progressão tumoral, ou seja, os efeitos da atividade física aeróbia sobre as alterações de marcadores de TILs-T e de TAMs seriam específicas para cada estágio do desenvolvimento tumoral, haja vista que os resultados encontrados nos tumores B16 poderiam estar associados com a sua primeira identificação mais tardia em relação aos demais tumores (Figura 8).

Figura 10: Efeitos da atividade física aeróbia sobre a resposta de marcadores de TILs-T e de TAMs. Análise de qPCR para marcadores relacionados à resposta dos TILs-T e dos TAMs nos tumores B16 (A), CT26 (B) e 4T1 (C). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Com esses resultados, nós observamos que a atividade física aeróbia parece promover alterações de marcadores de TILs-T e de TAMs que parecem ser específicas para cada tipo de câncer. Notavelmente, cada um dos modelos animais de câncer estudados apresentou respostas singulares de expressão gênica para marcadores já bem caracterizados relacionados aos TILs-T e aos TAMs. Desde que Betof *et al.* (2015) demonstram que a atividade física aeróbia promove a normalização da vasculatura tumoral (BETOF et al., 2015); uma vez que a efetividade do tratamento anti-angiogênese apresenta resultados limitados (CANTELMO et al., 2016); e desde que Wenes *et al.* (2016) demonstraram que a manutenção do metabolismo dos TAMs também promove a normalização da vasculatura tumoral, nós hipotetizamos que

um dos mecanismos envolvidos na atenuação do crescimento tumoral poderia estar relacionado ao do *cross-talk* entre os TAMs e as células endoteliais tumorais. Embora não tenhamos realizado análise de imagem para mostrar alterações estruturais nos vasos tumorais, além de não termos analisado isoladamente os TAMs, nossos resultados sugerem que esse mecanismo possa estar ocorrendo, porém, de forma singular para cada modelo de câncer testado. Para o modelo B16, nós observamos que a atividade física aeróbia aumenta a expressão gênica de marcadores de TAMs de tipo M2 e diminui a razão de expressão entre os marcadores de TAMs de tipo M1 e os TAMs de tipo M2 (M1/M2), sugerindo que possa estar ocorrendo uma maior polarização dos TAMs de tipo M2. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no estudo de Pedersen *et al.* (2016). Considerando que: a) a diminuição da expressão de CD4 esteja relacionada às células T regulatórias CD4⁺FOXP3⁺, b) que não foram observadas alterações nos marcadores de função de células T CD8⁺ e c) que a expressão gênica de PD-1 também diminui, é possível sugerir uma associação entre a atenuação do crescimento tumoral com a melhora do metabolismo e função fagocitária dos TAMs para o modelo B16.

Entretanto, esses resultados diferem dos encontrados no modelo CT26, os quais observou-se uma diminuição de marcadores de TAMs de tipo M2, aumento da razão de expressão M1/M2, diminuição da vascularização tumoral (Vegf α) e regiões de hipóxia tumoral (Hif1 α), além da diminuição do metabolismo glicolítico tumoral (Glut1). Em conjuntos, essas alterações podem estar associadas à diminuição dos TAMs de tipo 2 e das células endoteliais tumorais. Esse aumento da razão de expressão M1/M2 sugere um aumento da polarização dos TAMs para TAMs de tipo M1, supressão do crescimento tumoral pelo papel pró-inflamatório dos TAMs de tipo M1 e diminuição da vascularização pela diminuição dos TAMs de tipo M2 (ZHOU *et al.*, 2015).

5.3 ESTUDO II: Impacto da atividade física aeróbia prévia sobre a sobrevivência de camundongos com câncer.

Para demonstrar a relevância clínica da atividade física aeróbia e também avaliar se a atenuação do crescimento tumoral poderia estar associada a um aumento da sobrevivência dos animais, nós realizamos um protocolo de sobrevivência em camundongos inoculados com as

células tumorais B16. Nós selecionamos esse modelo de câncer para podermos realizar um paralelo com o estudo de Pedersen *et al.* que utilizou o mesmo modelo, porém, sem avaliar a sobrevida dos animais sedentários em comparação com os animais que realizaram atividade física aeróbia voluntária prévia (PEDERSEN *et al.*, 2016). Os animais do grupo *Wheel Running*+B16 foram pré-condicionados durante 90 dias. Após esse período, os animais foram inoculados com as células tumorais do melanoma B16 e a sobrevida foi acompanhada ao longo de 50 dias. Após 50 dias, os animais que sobreviveram foram sacrificados em virtude da extensão do volume tumoral seguindo recomendações das diretrizes para o bem-estar do uso de animais na pesquisa do câncer (WORKMAN *et al.*, 2010).

A Figura 11A mostra que o pré-condicionamento durante 90 dias aumentou o desempenho dos animais do grupo *Wheel Running*+B16. Já na Figuras 11B-C, observam-se as curvas de sobrevida tendo como ponto inicial de acompanhamento o dia da inoculação das células tumorais (Figura 11B) ou o dia da primeira identificação palpável do tumor sólido (Figura 11C). Embora não tenha sido observada diferença na sobrevida quando se acompanhou a sobrevida considerando o dia da inoculação como ponto inicial (Figura 11B), quando utilizado o momento da primeira identificação do tumor palpável (Figura 11C), os animais do grupo *Wheel Running*+B16 apresentaram uma maior sobrevida em comparação aos animais sedentários. Importante ressaltar que apenas 4 animais de um total de 11 do grupo *Wheel Running*+B16 morreram (36%), ao passo que no grupo SED+B16 morreram 9 animais de 12 (75%). Por fim, na Figura 11D observa-se que após 14 dias da inoculação das células tumorais B16, apenas 3 de 11 animais do grupo *Wheel Running*+B16 (27%) apresentaram tumores palpáveis, enquanto 8 de 12 animais do grupo SED+B16 (67%) já apresentavam tumores palpáveis, resultados semelhantes aos encontrados na Figura 8A. Um possível mecanismo que poderia explicar os nossos resultados seria em virtude de uma possível diminuição da capacidade metastática que a atividade física provocaria nesse tumor. De fato, já está bem estabelecido na literatura que o modelo B16F10 possui uma alta capacidade metastática (HOSHINO *et al.*, 2015; KAPLAN *et al.*, 2005; PEINADO *et al.*, 2012). Além disso, a metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer (ZHOU *et al.*, 2014). Finalmente, Pedersen *et al.* (2016) e Pigna *et al.* (2016) demonstraram que a atividade física aeróbia prévia aumentou a sobrevida de animais injetados com as células tumorais B16 e C26, respectivamente. Importante ressaltar que Pedersen *et al.* (2016) observaram uma diminuição bastante significativa de nódulos metastáticos no pulmão, principal região de metástase das

células B16F10, dos animais que realizaram atividade física aeróbia. Embora nós não tenhamos analisado a formação de nódulos metastáticos no pulmão desses animais, isso poderia ser um dos fatores envolvidos no aumento da sobrevida encontrado em nosso estudo.

Em conjunto, esses resultados demonstram a importância clínica da atividade física aeróbia prévia pela sua capacidade de aumentar a sobrevida de animais com câncer e também sugere que a atividade física aeróbia prévia pode retardar a iniciação tumoral no melanoma.

Figura 11: Efeitos da atividade física aeróbia sobre sobrevida do a animais inoculados com as células tumorais do melanoma B16. A: tempo até a exaustão no teste progressivo máximo. B: curva de sobrevida após a inoculação das células tumorais. C: curva de sobrevida após a primeira identificação do tumor. D: tempo para o surgimento do tumor após a inoculação das células tumorais B16. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de dois fatores, seguida de *pos hoc* de Bonferroni e Log-rank. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.4 ESTUDO III: Contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral

5.4.1 Impacto da sobrevivência sobre o perfil imunológico tumoral

Os mecanismos envolvidos na atenuação do crescimento tumoral pela atividade física aeróbia ainda são pouco entendidos. Betof *et al.* (2015) demonstraram que a atenuação do crescimento tumoral pela atividade física pode estar associada ao aumento da cobertura pericítica dos vasos tumorais (BETOF *et al.*, 2015). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa resposta não foram explorados. Pedersen *et al.* (2016) demonstraram a atividade física aeróbia é capaz de atenuar o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer através da mobilização e redistribuição das células NK da circulação para o tumor (PEDERSEN *et al.*, 2016). Os autores atribuem esse resultado exclusivamente às células NK, embora o próprio estudo tenha demonstrado que outros mecanismos relacionados ao sistema imune poderiam estar associados à essa atenuação do crescimento da tumoral.

Tendo em vista que a atividade física aeróbia modula o processo de neovascularização tumoral, e esse processo pode estar relacionado aos TAMs (CASAZZA *et al.*, 2013; RIES *et al.*, 2014; WENES *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2015), tomando por exemplo que a atividade física aeróbia modula a resposta imune inata (PEDERSEN *et al.*, 2016) e considerando-se que existe uma lacuna em entender os mecanismos envolvidos na resposta imune antitumoral induzida pela atividade física aeróbia, investigamos se a atividade física aeróbia poderia modular a resposta imune antitumoral.

Nossos resultados demonstraram que a atividade física aeróbia foi capaz de alterar a expressão de genes relacionados aos TILs-T e os TAMs. Entretanto, a análise de expressão gênica do tumor total fica enfraquecida por esse ambiente ser formado por diferentes tipos de células (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Como estratégia adotada na presente Dissertação para compreender de maneira mais específica o papel da atividade física aeróbia na resposta imune antitumoral, utilizamos uma abordagem *in silico* por meio *gene set enrichment analysis* (GSEA) para *Immunologic Signatures* para analisar o tumor de animais que realizaram atividade física aeróbia prévia. Essa análise é composta por 4872 *gene sets* de estudos que avaliaram algum tipo específico de célula do sistema imune, tornando os resultados encontrados mais próximos de alterações no sistema imune.

Primeiramente, nós utilizamos o GSEA para analisar 13 *datasets* de expressão gênica de tumores primários (maiores detalhes ver item 4.10) para determinar se existiria um padrão

de assinatura imunológica entre os pacientes do grupo “Vivo” e do grupo “Morto”. Na Figura 12A-M é mostrado que os pacientes do grupo “Vivo” também apresentavam uma maior sobrevida global em comparação aos pacientes do grupo “Morto”. Realizamos essa análise como controle prévio às demais análises usando *gene data sets*.

Figura 12: Impacto da sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A-M: Tempo de sobrevida global entre os pacientes dos grupos “Morto” e “Vivo” para os diferentes *datasets* utilizados. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

A análise de GSEA revelou que 7 dos 13 *datasets* analisados apresentaram enriquecimento de assinaturas imunológicas ou para os pacientes do grupo “Morto”, ou para o grupo “Vivo” ou para ambos os grupos. Na sequência, buscamos analisar se existiam assinaturas imunológicas em comum entre aqueles *datasets* que apresentassem enriquecimento de assinaturas imunológicas para o grupo “Morto” ou para o grupo “Vivo”. Como pode ser observado na Figura 13A, foram encontradas duas assinaturas imunológicas enriquecidas em comum para o grupo “Morto” dos diferentes *datasets*. Já para o grupo “Vivo”, apenas uma assinatura imunológica enriquecida é encontrada em comum entre os diferentes *datasets* (Figura 13B). Esses resultados demonstram que existe uma assinatura imunológica em comum entre tumores primários de diferentes tipos de câncer tanto para os pacientes presentes no grupo “Morto” (menor sobrevida) quanto para pacientes presentes no grupo “Vivo” (maior sobrevida).

Figura 13: Impacto da sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Comparação realizada através GSEA entre os grupos “Morto” e “Vivo” dos diferentes *datasets* utilizados. Para 7 dos 13 *datasets* analisados pelo GSEA a partir da base de dados de “*Immunologic signatures*” (MSigDB, C7) houve o enriquecimento de assinaturas imunológicas ou para o grupo “Morto”, ou para o grupo “Vivo” ou para ambos os grupos de cada um dos *datasets*. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes *datasets* que apresentaram enriquecimento de assinaturas imunológicas para o grupo “Morto”. B: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes *datasets* que apresentaram enriquecimento de assinaturas imunológicas para o grupo “Vivo”.

5.4.2. Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral

Pedersen *et al.* (2016) demonstraram que a atividade física aeróbia prévia é capaz de atenuar o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer em camundongos (PEDERSEN *et al.*, 2016). Para explorar os possíveis mecanismos envolvidos na atenuação do crescimento tumoral induzidos pela atividade física aeróbia, utilizamos o *dataset* do estudo de Pedersen *et al.* (2016) para identificar se existiriam enriquecimentos de assinaturas imunológicas para os tumores primários dos animais sedentários (Melanoma-SED) e para os tumores dos animais que realizaram atividade física aeróbia prévia (Melanoma-Exer). Após confirmar que tanto Melanoma (SED) quanto o Melanoma (Exer) apresentavam enriquecimentos de assinaturas imunológicas (dados não mostrados), buscamos avaliar se

existiriam assinaturas imunológicas enriquecidas em comum entre o Melanoma (Exer) e os tumores dos pacientes pertencentes ao grupo “Vivo” e o Melanoma (SED) e os tumores dos pacientes pertencentes ao grupo “Morto”.

Como no *dataset* do estudo de Pedersen *et al.* (2016) foram analisados os tumores do melanoma B16, nós primeiro avaliamos se existiriam assinaturas imunológicas em comum entre o (Melanoma-SED) e dos tumores dos pacientes com melanoma pertencentes ao grupo “Morto” (Melanoma-“Morto”) e o Melanoma (Exer) e dos tumores dos pacientes com melanoma pertencentes ao grupo “Vivo” (Melanoma-“Vivo”).

A Figura 14A mostra que nenhuma assinatura imunológica é encontrada em comum entre o Melanoma (“Morto”) e o Melanoma (SED). Resultado semelhante é mostrado na Figura 14B, na qual são encontradas apenas 2 assinaturas imunológicas em comum entre o Melanoma (“Vivo”) e o Melanoma (SED). Esses resultados sugerem que o fenótipo sedentário não parece exercer influência sobre a sobrevida dos pacientes, o que de fato era esperado. Já o contrário é observado quando os fenótipos de alta sobrevida (“Vivo”) e fisicamente ativo (Exerc) são usados na análise de enriquecimento. Na Figura 14C observa-se o compartilhamento de 1149 assinaturas imunológicas entre o Melanoma (Vivo) e o Melanoma (Exer). Por fim, na Figura 14D é mostrado que não existe nenhuma assinatura imunológica em comum entre o Melanoma (Morto) e o Melanoma (Exer). Portanto, aqui é observado que o fenótipo fisicamente ativo pode estar associado com o aumento da sobrevida dos pacientes com câncer. Conjuntamente, esses resultados sugerem que a atividade física aeróbia prévia promove assinaturas imunológicas semelhantes aos pacientes com melanoma que apresentaram maior sobrevida.

Figura 14: Relação entre atividade física aeróbica prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Morto”) e Melanoma (SED). B: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Vivo”) e Melanoma (SED). C: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Vivo”) e Melanoma (Exer). D: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os grupos Melanoma (“Morto”) e Melanoma (Exer).

Diante do fato de termos encontrado apenas assinaturas imunológicas em comum entre o Melanoma (“Vivo”) e o Melanoma (Exer) e nenhuma para o Melanoma (“Vivo”) e o Melanoma (SED), procuramos entender quais seriam os possíveis mecanismos envolvidos nessa resposta. Com o intuito de verificar se os resultados seriam semelhantes para outros tipos de câncer, testamos se essas assinaturas imunológicas também poderiam ser compartilhadas com os *datasets* que apresentassem assinaturas imunológicas enriquecidas para os pacientes pertencentes ao grupo “Vivo”. Como mostrado na Figura 15A-B, apenas uma assinatura imunológica (GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP) foi

encontrada em comum entre os *datasets* analisados. Interessantemente, essa assinatura imunológica está associada com uma menor ativação e função das T CD4 V β 2⁺ de memória, obtidas do sangue circulante de indivíduos jovens, não estimuladas com o superantígeno *toxic shock syndrome toxin* (TSST) e com células dendríticas mielóides (mDC) em comparação com células T CD4 V β 2⁺ de memória estimuladas com TSST e com mDC. Esses resultados sugerem que a atividade física aeróbia prévia altera a resposta imune de memória no microambiente tumoral, mais especificamente das células T CD4 V β 2⁺, e isso está associado a uma atenuação do crescimento tumoral e aumento da sobrevida de pacientes com melanoma, câncer de mama, câncer de ovário e linfoma.

Figura 15: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes *datasets* para o grupo “Vivo” e Melanoma (Exer). B: Plots de enriquecimento gerados pelo GSEA para a assinatura imunológica compartilhada (GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP). Os gráficos mostram a assinatura gênica da assinatura imunológica compartilhada.

A análise de GSEA também forneceu os genes que participaram do core de enriquecimento da assinatura imunológica compartilhada (GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP) entre os diferentes *datasets* analisados (Figuras 16A-D). Diante disso, a mesma estratégia foi utilizada para identificar quais desses genes estariam compartilhados entre esses *datasets*. A Figura 15F mostra que foram encontrados 5 genes em comum: PTGER4 (*Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype*); BTG2 (*BTG anti-proliferation factor 2*); CD69 (*Early activation antigen CD69*); DUSP1 (*Dual specificity protein phosphatase 1*); CFH (*Complement factor H*); JUNB (*Transcription factor jun-B*).

Figura 16: Relação entre atividade física aeróbica prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A-E: Heatmap dos genes que participam do core de enriquecimento para a assinatura imunológica

(GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP) compartilhada entre os diferentes *datasets*. F: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento dos genes que participam do core de enriquecimento entre os diferentes *datasets*.

Com o intuito de demonstrar a relevância clínica dos genes encontrados, utilizamos os dados de cada um dos *datasets* (melanoma, câncer de mama, câncer de ovário e linfoma) para realizar uma análise de Log-rank (sobrevida) para verificar se aqueles pacientes que apresentavam maior expressão gênica no tumor para cada um dos genes encontrados, eram aqueles que apresentavam maior sobrevivência. De fato, como mostrado nas Figuras 17 e 18, os pacientes com melanoma e câncer de mama que apresentaram maior expressão de genes PTGER4, BTG2, CD69, DUSP1 e CFH foram aqueles com maior sobrevivência em comparação àqueles pacientes que apresentaram uma menor expressão para esses genes. Já na Figura 19 se observa que os pacientes com linfoma que apresentaram maior expressão de BTG2, DUSP1 e CFH (três genes comuns aos cinco observados no melanoma e câncer de mama) foram aqueles com maior sobrevivência. Por fim, na Figura 20 é mostrado que para o câncer de ovário não existe nenhuma relação entre esses genes e a sobrevivência dos pacientes. Como os pacientes com melanoma e com câncer de mama apresentaram 100% de compartilhamento na associação dos genes com a sobrevivência (Figura 21A-D), optamos por seguir com as próximas análises nos genes em comum entre o melanoma e o câncer de mama.

Tumor Melanoma Metastatic - Bhardwaj - 44
fRMA - u133p2

Figura 17: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com melanoma metastático com alta expressão de BTG2, CFH, DUSP1, PTGER4, CD69 e JUNB (azul) e baixa expressão de BTG2, CFH, DUSP1, PTGER4, CD69 e JUNB (vermelho). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Melanoma Metastatic – Bhardwaj – 44 – fRMA – u133p2” (<http://r2.amc.nl>).

Tumor Breast - Bergh - 159
MAS5.0 - u133a

Figura 18: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com câncer de mama com alta expressão de BTG2, CD69, CFH, DUSP1, PTGER4 e JUNB (azul) e baixa expressão de BTG2, CD69, CFH, DUSP1, PTGER4 e JUNB (vermelho). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Breast – Bergh – 159 – MAS5.0 – u133a” (<http://r2.amc.nl>).

Tumor Lymphoma (T-cell Peripheral) - Rosenwald - 193
MAS5.0 - u133p2

Figura 19: Relação entre atividade física aeróbica prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com linfoma com alta expressão de BTG2, CFH, DUSP1, JUNB, CD69 e PTGER4 (azul) e baixa expressão de BTG2, CFH, DUSP1, JUNB, CD69 e PTGER4 (vermelho). A sobrevida analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Lymphoma (T-cell Peripheral) – Rosenwald – 193 – MAS5.0 – u133p2” (<http://r2.amc.nl>).

Figura 20: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com câncer de ovário com alta expressão de PTGER4, CD69, BTG2, CFH, DUSP1 e JUNB (azul) e baixa expressão de PTGER4, CD69, BTG2, CFH, DUSP1 e JUNB (vermelho). A sobrevida foi analisada por teste Log Rank utilizando-se o dataset “R2: Tumor Ovarian – Pamula-Pilat – 101 – MAS5.0 – u133p2” (<http://r2.amc.nl>).

Figura 21: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento dos genes associados com a sobrevida dos pacientes com melanoma e câncer de mama (Figuras 15 e 16) e que participam do core de enriquecimento entre o Melanoma (Vivo) e o Mama (Vivo). B-D: Heatmap dos genes compartilhados e associados com a sobrevida dos pacientes com Melanoma (D) e Câncer de Mama (C) e com o Melanoma B16F10 (B).

Como a análise de “*Immunologic Signatures*” realizada pelo GSEA comparou os 13 *datasets* utilizados nesse estudo com outros 4872 *datasets* de estudos que avaliaram algum tipo específico de célula do sistema imune, nós nos perguntamos se as alterações dos genes encontrados não poderiam ser em algum tipo específico de célula do sistema imune presente no microambiente tumoral. Diante disso, buscamos primeiramente entender em qual tecido esses genes são mais expressos. Como mostrado na Figura 22, com exceção do CFH, esses genes apresentam maior expressão em macrófagos e mastócitos, reforçando a especificidade da análise de assinatura imunológica feita pelo GSEA.

Figura 22: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 19A-D) em diferentes tecidos (<http://biogps.org> - GSE10246).

Diante desses resultados, avaliamos, a seguir, em que tipo de célula imunológica específica esses genes são mais expressos. Utilizando o *dataset* do *ImmGen* que disponibiliza os dados de expressão gênica de mais de 270 tipos de células imunológicas diferentes. Com isso, nós observamos que esses genes são mais expressos nas populações de células dendríticas, macrófagos, monócitos, neutrófilos, células estromais, linfócitos inatos, eosinófilos, mastócitos e basófilos (Figura 23), enquanto que são menos expressos nas populações de células tronco, células B, células T $\alpha\beta$, células T $\gamma\delta$ e células T ativadas (Figura 24).

Figura 23: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 19A-D) em

diferentes populações de células imunes (<https://www.immgen.org> - GSE15907 e GSE37448).

Figura 24: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 19A-D) em diferentes populações de células imunes (<https://www.immgen.org> - GSE15907 e GSE37448).

Para tentar confirmar que os resultados encontrados eram específicos para alterações nas células do sistema imune, nós avaliamos se o treinamento físico aeróbio poderia alterar a expressão desses genes nas células tumorais. Para isso, utilizamos o *dataset* (GSE46925) de mulheres com câncer de mama que realizaram treinamento físico aeróbio durante 12 semanas ou que permaneceram sedentárias pelo mesmo período. Os soros dessas pacientes foram usados para incubar células tumorais de câncer de mama humano (MDA-MB-231). Como mostrado na Figura 25A, quando as células tumorais MDA-MB-231 são incubadas com o soro das pacientes treinadas, a expressão dos genes não foi alterada, com exceção de DUSP1, sugerindo que os resultados encontrados são em virtude dos efeitos da atividade física aeróbia sobre as células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral. Além disso, o GSEA foi utilizado para verificar se o *dataset* (GSE46925) das células tumorais tratadas com o soro das pacientes sedentárias e das células tumorais tratadas com o soro das pacientes treinadas apresentariam enriquecimento para o a assinatura imunológica GSE36476_CTRL_VS_TSST_ACT_72H_MEMORY_CD4_TCELL_YOUNG_UP. Como esperado, nem as células tumorais tratadas com o soro das pacientes sedentárias e nem as

células tumorais tratadas com o soro das pacientes treinadas apresentaram enriquecimento dessa assinatura imunológica (dados não mostrados).

Com o intuito de verificar se os cinco genes comuns apontados pela análise do GSEA nos datasets de câncer de mama e melanoma estariam diferencialmente expressos em nossos modelos experimentais, analisamos os tumores dos animais inoculados com as células tumorais 4T1 pós período de treinamento físico aeróbio prévio em esteira rolantes e comparamos com os que foram mantidos sedentários. A Figura 25B mostra que o treinamento físico prévio foi eficiente em aumentar a expressão de CFH, PTGER4 e BTG2, reforçando que os resultados encontrados pela análise de GSEA estejam de fato relacionado às alterações induzidas pela atividade física aeróbia nas células imunes infiltrantes de tumor.

Em resumo, esses resultados sugerem que a atividade física aeróbia prévia promove uma assinatura imunológica semelhante aos pacientes que apresentaram maior sobrevida e que essa assinatura parece ocorrer em virtude das alterações geradas em populações específicas de células imunológicas presentes no microambiente tumoral e não nas células tumorais. Além disso, nós também encontramos que cinco dos seis genes encontrados apresentam uma associação com a sobrevida de pacientes com melanoma e câncer de mama, sendo que aqueles pacientes que apresentaram maior expressão para esses genes foram aqueles que apresentaram maior sobrevida.

Figura 25: Relação entre atividade física aeróbia prévia e sobrevida sobre o perfil imunológico tumoral. A: Expressão de PTGER4, BTG2, DUSP1, CD69 e CFH em células tumorais do câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento aeróbio durante 12 semanas. B: Expressão de CFH,

PTGER4, BTG2, DUSP1 e CD69 nos tumores 4T1 no modelo de câncer de mama submetido ao treinamento físico aeróbio prévio no nosso estudo. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

5.4.3. Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral.

Nós demonstramos que a atividade física aeróbia prévia pode gerar alterações no tumor semelhantes àsquelas encontradas em pacientes com maior sobrevida. Como a atividade física aeróbia também parece melhorar a eficiência do tratamento com quimioterápico por mecanismos ainda desconhecidos e como a imunoterapia (BETOF et al., 2015), seja com anti-CTLA-4 ou anti-PD1, é efetiva somente em uma pequena parcela de pacientes (MANGUSO et al., 2017), continuamos buscando possíveis mecanismos envolvidos na contribuição da atividade física aeróbia para a resposta imune antitumoral. Baseados no exposto acima, testamos se a atividade física aeróbia também poderia promover assinaturas imunológicas semelhantes aos animais sensíveis ao tratamento com anti-CTLA-4 e aos pacientes com câncer de próstata após o tratamento com anti-CTLA-4.

Como mostrado na Figura 26A-D, foi encontrada uma assinatura imunológica em comum (GSE7509_UNSTIM_VS_FCGR1IB_STIM_MONOCYTE_DN) entre os animais que responderam ao tratamento com anti-CTLA-4, os pacientes pós tratamento com anti-CTLA-4 e os animais que realizaram atividade física aeróbia prévia. Essa assinatura imunológica está associada à resposta de monócitos estimulados com anti-FcγRIIB em comparação com monócitos não estimulados com anti-FcγRIIB, ambos, obtidos do sangue de indivíduos jovens saudáveis. O tratamento com anti-FcγRIIB induz a maturação das células dendríticas derivadas de monócitos e aumenta a expressão de genes induzidos por IFN de tipo I. Além disso, monócitos tratados com anti-FcγRIIB também apresentam aumento na expressão de genes induzidos por IFN de tipo I. Essa indução da resposta de IFN de tipo I já foi demonstrado como mecanismo capaz de atenuar o crescimento tumoral (DHODAPKAR et al., 2007). Portanto, esses resultados sugerem que a atividade física aeróbia prévia induz uma resposta de IFN de tipo I em monócitos semelhante ao tratamento com anti-FcγRIIB e isso está associado a uma atenuação do crescimento tumoral. Quando analisado os genes que participam do core de enriquecimento dessa assinatura imunológica, nós encontramos 7 genes

em comum entre os 3 *datasets* (TET2 - *Methylcytosine dioxygenase Ten-Eleven-Translocation-2*, MTX3 - *Metaxin-3*, NFAT5 - *Nuclear factor of activated T-cells 5*, MACF1 - *Microtubule-actin cross-linking factor 1*, PARP8 - *Poly [ADP-ribose] polymerase 8*, SON - *SON DNA binding protein* e PHC3 - *Polyhomeotic-like protein 3*) (Figura 27A-D).

Figura 26: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. A: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento de assinaturas imunológicas entre os diferentes *datasets* para o grupo “anti-CTLA-4” e Melanoma (Exer). B: Plots de enriquecimento gerados pelo GSEA para a assinatura imunológica compartilhada (GSE7509_UNSTIM_VS_FCGRIB_STIM_MONOCYTE_DN). Os gráficos mostram a assinatura gênica da assinatura imunológica compartilhada.

Figura 27: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. A-C: Heatmap dos genes que participam do core de enriquecimento para a assinatura imunológica (GSE7509_UNSTIM_VS_FCGR1IB_STIM_MONOCYTE_DN) compartilhada entre os diferentes *datasets*. F: Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento dos genes que participam do core de enriquecimento entre os diferentes *datasets*.

Na sequência, avaliamos se esses genes poderiam estar associados com a sobrevida de pacientes com câncer. Dado que a plataforma R2 (<http://r2.amc.nl>) não fornece a análise de sobrevida de pacientes com câncer de próstata, nós avaliamos esses genes apenas nos pacientes com melanoma. Como mostrado na Figura 28, dos 7 genes avaliados, 4 (PHC3, TET2, PARP8 e MACF1) apresentaram relação com a sobrevida dos pacientes, mais especificamente, aqueles pacientes que apresentaram maior expressão para esses genes foram aqueles com maior sobrevida.

Figura 28: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Sobrevida global de pacientes com melanoma metastático com alta expressão de PHC3, TET2, MACF1, PARP8, NFAT5, MTX3 e SON (azul) e baixa expressão de PHC3, TET2, MACF1, PARP8, NFAT5, MTX3 e SON (vermelho). A sobrevida foi calculada com o “R2: Tumor Melanoma Metastatic – Bhardwaj – 44 – fRMA – u133p2” dataset (<http://r2.amc.nl>).

Novamente, procuramos verificar se esses genes também estariam mais expressos em células do sistema imune do que em outros tecidos. Deste modo, a Figura 29 mostra que embora esses genes sejam expressos em outros tecidos, a maior expressão ocorre em células do sistema imune como, por exemplo, células dendríticas e macrófagos (PARP8), células B (MACF1) e células T regulatórias (PHC3). Como o *dataset* utilizado para essa análise não apresenta os valores de expressão para TET2, este não é apresentado na Figura 29.

Figura 29: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 25A-D) em diferentes tecidos (<http://biogps.org> - GSE10246).

Na sequência, avaliamos em quais células do sistema imune esses genes seriam mais expressos. Como mostrado nas Figuras 30 e 31, PARP8 apresenta uma maior expressão na população de células dendríticas, PHC3 na população de células estromais, TET2 na população de mastócitos e basófilos e MACF1 na população de células B e células T ativadas.

Figura 30: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 25A-D) em diferentes populações de células imunes (<https://www.immgen.org> - GSE15907 e GSE37448).

Figura 31: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão dos genes compartilhados (Mostrados na 25A-D) em diferentes populações de células imunes (<https://www.immgen.org> - GSE15907 e GSE37448).

Por fim, nós avaliamos se a atividade física aeróbia poderia alterar a expressão desses genes especificamente nas células tumorais. Utilizando a mesma estratégia usada anteriormente, quando as células tumorais do câncer de mama MDA-MB-231 foram tratadas com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento físico aeróbio, foi observado apenas uma redução na expressão de MACF1 ao passo que os outros genes não foram alterados (Figura 32), sugerindo, novamente, que os resultados encontrados são em decorrência dos efeitos da atividade física aeróbia nas células do sistema imune. Portanto, esses resultados sugerem que a atividade física aeróbia prévia também pode promover alterações no microambiente tumoral semelhante ao tratamento com anti-CTLA-4. Mais especificamente, essas alterações parecem ocorrer nas células do sistema imune.

Figura 32: Relação entre atividade física aeróbia prévia e imunoterapia sobre o perfil imunológico tumoral. Expressão de TET2, MACF1, PARP8 e PHC3 em células tumorais do câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento aeróbio durante 12 semanas. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados bicaudal. * $p < 0.05$.

A literatura demonstra que a atividade física aeróbia é capaz de diminuir a incidência de diversos tipos de câncer assim como atenuar o crescimento tumoral (BETOF et al., 2015; GOH et al., 2013; GOH; LADIGES, 2014; JU et al., 2008; MEHL et al., 2005; MICHNA et al., 2006; MOORE et al., 2016; PARRY; HAYWARD, 2015; PEDERSEN et al., 2016). Muitos desses estudos demonstram que a atividade física aeróbia diminui a anormalidade dos vasos sanguíneos e das regiões de hipóxia presentes no microambiente tumoral (BETOF et al., 2015; JONES et al., 2010; MCCULLOUGH et al., 2014), tornando os efeitos da quimioterapia mais efetivo (BETOF et al., 2015). *Pedersen et al.* (2016) demonstraram pela primeira vez a interação entre o músculo esquelético, o sistema imune inato e a resposta imune antitumoral proporcionada pela atividade física aeróbia, a qual tornou a imunidade sistêmica inata mais eficiente no combate à progressão da doença (PEDERSEN et al., 2016).

Entretanto, os mecanismos pelos quais a atividade física aeróbia atenua o crescimento tumoral ainda precisam ser esclarecidos. No sentido de contribuir para a compreensão destes mecanismos, encontramos um repertório de alterações imunológicas que ocorrem no microambiente tumoral de animais que realizaram atividade física aeróbia prévia, as quais se assemelham aos pacientes que apresentaram maior sobrevida e aos animais sensíveis ao tratamento com anti-CTLA-4. Após demonstrarmos que a atividade física aeróbia prévia foi capaz de atenuar o crescimento tumoral em três diferentes modelos de câncer e, também, aumentar a sobrevida dos animais, identificamos que a atividade física aeróbia promove alterações imunológicas tumorais semelhantes aos pacientes com câncer de mama, melanoma, linfoma e câncer de ovário que apresentaram maior sobrevida.

Notavelmente, o aumento da expressão gênica de PTGER4, BTG2, CD69, DUSP1 e CFH no microambiente tumoral está associado ao aumento da sobrevida de pacientes com câncer de mama e melanoma. O aumento na expressão desses genes talvez esteja ocorrendo em algum outro tipo de célula presente no microambiente tumoral que não sejam as células tumorais, pois o tratamento das células tumorais do câncer de mama com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento físico aeróbio não alterou a expressão desses genes.

A imunoterapia é um dos tratamentos mais promissores no combate ao câncer, embora poucos pacientes respondam ao tratamento (MANGUSO et al., 2017). Diante disso, estudos recentes buscam entender quais são os mecanismos envolvidos na resistência ou sensibilidade à imunoterapia (ARCE VARGAS et al., 2016; GAO et al., 2017; GORDON et al., 2017; GUBIN et al., 2014; KAMPHORST et al., 2017; MANGUSO et al., 2017; SPITZER et al., 2017; STEELE et al., 2016; WILLIAMS et al., 2016). Na presente dissertação, observamos que a atividade física aeróbia também promove alterações imunológicas tumorais semelhantes aos animais com melanoma sensíveis ao tratamento com anti-CTLA-4 e aos pacientes com câncer de próstata pós tratamento com anti-CTLA-4. Alguns dos genes relacionados à essa alteração imunológica, PHC3, TET2, PARP8 e MACF1, quando aumentados no microambiente tumoral, estão associados à maior sobrevida de pacientes com melanoma. Novamente, essas alterações imunológicas observadas parecem ocorrer especificamente nas células imunes infiltrantes de tumor, pois o tratamento das células tumorais do câncer de mama com o soro de pacientes com câncer de mama que realizaram treinamento físico

aeróbio não ocasionou as mesmas alterações imunológicas observadas nos tumores dos animais e pacientes.

Nós demonstramos que a atividade física aeróbia é capaz de atenuar o crescimento tumoral por mecanismos distintos relacionados ao sistema imune, tornando-a uma potente ferramenta no combate ao câncer. Os estudos futuros são necessários para melhor compreender se a atividade física aeróbia modula as células do sistema imune em condições saudáveis, tornando-as mais eficientes no combate a infecções e ao câncer, além de buscar quais seriam os mecanismos envolvidos nesse *cross-talk* entre atividade física aeróbia, músculo esquelético e sistema imune. Além disso, é necessário entender se a atividade física aeróbia aumenta a capacidade de resistência à exaustão das células do sistema imune no microambiente tumoral. Por fim, é de fundamental importância entender se o músculo esquelético fisicamente ativos é capaz de combater diretamente as células tumorais. Nossos resultados expandem as possibilidades de como a atividade física aeróbia pode tornar a resposta imune antitumoral mais eficiente, assim, atenuando a progressão da doença e aumentando a sobrevida e, quiçá, a qualidade de vida do paciente.

6 CONCLUSÃO

A atividade física aeróbia atenuou o crescimento tumoral em três diferentes modelos de câncer em animais, assim como aumentou a sobrevida de animais com melanoma B16F10. Além disso, também modulou os TILs-T e os TAMs de maneira tumor-específica. Por meio da análise de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), observamos que a atividade física aeróbia prévia gerou uma assinatura imunológica tumoral semelhante entre pacientes com diferentes tipos de câncer e uma maior sobrevida. Essa assinatura imunológica sugere que quando esses genes estão aumentados nos tumores de pacientes com melanoma, câncer de mama e linfoma, os pacientes apresentam maior sobrevida. A análise de GSEA também demonstrou que a atividade física aeróbia foi capaz de induzir uma assinatura imunológica semelhante aos animais com melanoma B16F10 sensíveis ao tratamento com o imunoterápico CTLA-4 e pacientes pós-tratamento com anti-CTLA-4. Essa assinatura imunológica sugere que esses genes estão aumentados nos tumores de pacientes com melanoma, os pacientes apresentavam uma maior sobrevida. Portanto, nossos dados fornecem evidências de que a

atividade física aeróbia é uma potente ferramenta no combate à progressão da doença pela sua capacidade de tornar a resposta imune antitumoral mais eficiente.

7. REFERÊNCIAS

- ARCE VARGAS, F. et al. Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. **Immunity**, v. 46, n. 4, p. 577–586, 2016.
- BERGERS, G. et al. Benefits of targeting both pericycles and endothelial cells in the tumour vasculature with kinase inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1287–1295, 2003.
- BETOF, A. S. et al. Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 5, p. 1–5, 2015.
- BILD, A. H. et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. **Nature**, v. 439, n. January, p. 353–357, 2006.
- BOGUNOVIC, D. et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20429–20434, 2009.
- BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143–1211, 2012.
- BRAND, A. et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. **Cell Metabolism**, p. 1–15, 2016.
- CANTELMO, A. R. et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. **Cancer Cell**, v. 30, n. 6, p. 968–985, 2016.
- CASAZZA, A. et al. Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. **Cancer Cell**, v. 24, n. 6, p. 695–709, 2013.
- CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 100, n. 2, p. 126–31, 1985.
- CHANG, C. H. et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1229–1241, 2015.
- CHOI, W. et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. **Cancer Cell**, v. 25, n. 2, p. 152–165, 2014.
- COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–63, 2014.
- COSTA-SILVA, B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature Cell Biology**, v. 17, p. 816–826, 2015.
- CRAMER, L. et al. Cardiovascular function and predictors of exercise capacity in patients with colorectal cancer. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 13, p. 1310–1319, 2014.
- DESANTIS, C. E. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2014. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, p. 252–271, 2014.
- DHODAPKAR, K. M. et al. Selective blockade of the inhibitory Fcγ receptor (FcγRIIB) in human dendritic cells and monocytes induces a type I interferon response program. **Journal**

of **Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1359–1369, 2007.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.

FIUZA-LUCES, C. et al. Exercise is the real polypill. **Physiology (Bethesda)**, v. 28, n. 5, p. 330–358, 2013.

FLACHENECKER, P. Autoimmune diseases and rehabilitation. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 3, p. 219–225, 2012.

FLINT, T. R. et al. Tumor-Induced IL-6 Reprograms Host Metabolism to Suppress Anti-tumor Immunity Article Tumor-Induced IL-6 Reprograms Host Metabolism to Suppress Anti-tumor Immunity. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 5, p. 1–13, 2016.

FLYNN, J. M. et al. Myogenin regulates exercise capacity and skeletal muscle metabolism in the adult mouse. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

FRIEDENREICH, C. M.; CUST, A. E. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. **British journal of sports medicine**, v. 42, n. 8, p. 636–647, 2008.

GAO, J. et al. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. **Nature medicine**, v. 23, n. 5, p. 551–555, 2017.

GOH, J. et al. Exercise training in transgenic mice is associated with attenuation of early breast cancer growth in a dose-dependent manner. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80123, 2013.

GOH, J.; LADIGES, W. C. Exercise enhances wound healing and prevents cancer progression during aging by targeting macrophage polarity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 139, n. 1, p. 41–48, 2014.

GORDON, S. R. et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 495–499, 2017.

GUBIN, M. M. et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 577–581, 2014.

HAMID, O. et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 2, p. 134–44, 2013.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell Press**, v. 100, n. 7, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAMURA, I. et al. Prognostic value of Cyclin D2 mRNA expression in newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose chemotherapy and tandem autologous stem cell transplantations. **Leukemia**, v. 20, n. 7, p. 1288–1290, 2006.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. v. 16, n. 169, p. 1–7, 2015.

HIGGINS, K. A. et al. Exercise-induced lung cancer regression: Mechanistic findings from a mouse model. **Cancer**, v. 120, n. 21, p. 3302–3310, 2014.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 58–65, 2008.

HODI, F. S. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 8, p. 711–723, 2010.

HOJMAN, P. et al. Voluntary exercise prevents cisplatin-induced muscle wasting during chemotherapy in mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e109030, 2014.

HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329–335, 2015.

HØYDAL, M. A et al. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. **European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation**, v. 14, n. 6, p. 753–760, 2007.

IQBAL, J. et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. **Blood**, v. 123, n. 19, p. 2915–2924, 2014.

JOHNSON, D. B. et al. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 18, p. 1749–1755, 2016.

JONES, L. W. et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 2, p. 343–348, 2010.

JONES, L. W. et al. Cardiopulmonary function and age-related decline across the breast cancer: Survivorship continuum. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 20, p. 2530–2537, 2012.

JU, J. et al. Voluntary exercise inhibits intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice and azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. **BMC cancer**, v. 8, n. 316, 2008.

KAMPHORST, A. O. et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1 – targeted therapies is CD28-dependent. **Science**, v. 355, n. 6332, p. 1423–1427, 2017.

KAPLAN, R. N. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 820–7, 2005.

KAWAGUCHI, A. et al. Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with glioblastoma. **Cancer Science**, v. 104, n. 9, p. 1205–1210, 2013.

KEMI, O. J. et al. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 4, p. 1301–1309, 2002.

KNOLS, R. et al. Physical exercise in cancer patients during and after medical treatment: A systematic review of randomized and controlled clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16, p. 3830–3842, 2005.

KOCH, L. G. et al. Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. **Circulation Research**, v. 109, n. 10, p. 1162–1172, 2011.

KOELWYN, G. J.; JONES, L. W.; MOSLEHI, J. Unravelling the causes of reduced peak oxygen consumption in patients with cancer: Complex, timely, and necessary. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 13, p. 1320–1322, 2014.

KOKKINOS, P. et al. Exercise capacity and mortality in black and white men. **Circulation**, v. 117, n. 5, p. 614–622, 2008.

LAKOSKI, S. G. et al. Midlife Cardiorespiratory Fitness, Incident Cancer, and Survival After Cancer in Men: The Cooper Center Longitudinal Study. **JAMA Oncol**, v. 1, n. 2, p. 231–237, 2015.

LAMBERT, M. I. et al. Tests of running performance do not predict subsequent spontaneous running in rats. **Physiology and Behavior**, v. 60, n. 1, p. 171–176, 1996.

LAUSS, M.; KRISTINA, L. A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 3377–3387, 2012.

LENZ, G. et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 22, p. 2313–2323, 2008.

LIM, J. H. et al. Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. **Cancer Research**, v. 74, n. 13, p. 3535–3545, 2014.

LISOWSKA, K. M. et al. Gene expression analysis in ovarian cancer – faults and hints from DNA microarray study. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. 6, p. 1–11, 2014.

LU, F. et al. Olig2-Dependent Reciprocal Shift in PDGF and EGF Receptor Signaling Regulates Tumor Phenotype and Mitotic Growth in Malignant Glioma. **Cancer Cell**, v. 29, n. 5, p. 669–683, 2016.

LUND, J. et al. Exercise training promotes cardioprotection through oxygen-sparing action in high fat-fed mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 8, p. H823–H829, 2015.

LUO, C. et al. A PGC1 α -mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 422–426, 2016.

MANGUSO, R. T. et al. In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. **Nature**, v. 547, n. 7664, p. 413–418, 2017.

MARCALETTI, S.; THOMAS, C.; FEIGE, J. N. Exercise Performance Tests in Mice. **Current protocols in mouse biology**, v. 1, n. 1, p. 141–54, 2011.

MARCELIN, G. et al. Genetic control of ATGL-mediated lipolysis modulates adipose triglyceride stores in leptin-deficient mice. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 5, p. 964–72, 2012.

MARTINEZ-JIMENEZ, C. P. et al. Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation. **Science**, v. 1436, n. 6332, p. 1433–1436, 2017.

MAXWELL, A. J. et al. L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. **J Appl Physiol**, v. 90, n. 3, p. 933–938, 2001.

MCCULLOUGH, D. J. et al. Modulation of blood flow, hypoxia, and vascular function in orthotopic prostate tumors during exercise. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 4, p. 1–8, 2014.

MEHL, K. A et al. Decreased intestinal polyp multiplicity is related to exercise mode and gender in ApcMin/+ mice. **Journal of applied physiology**, v. 98, n. 6, p. 2219–2225, 2005.

MICHNA, L. et al. Inhibitory effects of voluntary running wheel exercise on UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 10, p. 2108–2115, 2006.

MILLE-HAMARD, L. et al. Transcriptional modulation of mitochondria biogenesis pathway at and above critical speed in mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 405, n. 1–2, p. 223–232, 2015.

MOORE, S. C. et al. Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. **JAMA Internal Medicine**, v. 175, n. 6, p. 959–967, 2016.

MURAT, A. et al. Stem Cell – Related “ Self-Renewal ” Signature and High Epidermal Growth Factor Receptor Expression Associated With Resistance to Concomitant Chemoradiotherapy in Glioblastoma. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 26, n. 18, p. 3015–3024, 2017.

NEILSON, H. K. et al. Physical activity and postmenopausal breast cancer: Proposed biologic mechanisms and areas for future research. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 1, p. 11–27, 2009.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

PAHOR, M. et al. Effect of structured physical activity on prevention of major mobility disability in older adults: the LIFE study randomized clinical trial. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 23, p. 2387–96, 2014.

PARRY, T. L.; HAYWARD, R. Exercise Training Does Not Affect Anthracycline Anti-Tumor Efficacy While Attenuating Cardiac Dysfunction. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 15, n. 309, p. 675–683, 2015.

PAWITAN, Y. et al. Research article Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts.

Breast Cancer Research, v. 7, n. 6, p. 953–964, 2005.

PEDERSEN, L. et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 554–562, 2016.

PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature medicine**, v. 18, n. 6, p. 883–91, 2012.

PIETROCOLA, F. et al. Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. **Cancer Cell**, v. 30, p. 147–160, 2016.

PIN, F. et al. Combination of exercise training and erythropoietin prevents cancer-induced muscle alterations. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, 2015.

PUSAPATI, R. V. et al. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. **Cancer Cell**, v. 29, p. 1–15, 2016.

QU, L. et al. Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. **Cancer Cell**, v. 29, p. 1–16, 2016.

RIES, C. H. et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 846–859, 2014.

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

SAVOLA, S. et al. High Expression of Complement Component 5 (C5) at Tumor Site Associates with Superior Survival in Ewing's Sarcoma Family of Tumour Patients. **ISRN Oncology**, v. 2011, n. 168712, p. 1–10, 2011.

SCHARPING, N. E. et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 1–15, 2016.

SCHEFER, V.; TALAN, M. I. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. **Experimental gerontology**, v. 31, n. 3, p. 387–92, 1996.

SCHIPPERS, M.-P.; LEMOINE, C. M. R.; MCCLELLAND, G. B. Patterns of fuel use during locomotion in mammals revisited: the importance of aerobic scope. **The Journal of experimental biology**, v. 217, n. Pt 18, p. 3193–3196, 2014.

SCHMITZ, K. H. et al. Controlled Physical Activity Trials in Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. July, p. 1588–1595, 2005.

SMITH, J. J. et al. Experimentally Derived Metastasis Gene Expression Profile Predicts Recurrence and Death in Patients With Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 3, p. 958–968, 2010.

SPEAKMAN, J. R. Measuring energy metabolism in the mouse - theoretical, practical, and analytical considerations. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 34, p. 1–23, 2013.

SPITZER, M. H. M. H. et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 3, p. 487–502, 2017.

STEELE, C. W. et al. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 29, n. 6, p. 832–845, 2016.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. [s.l.: s.n.].

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.

SWALLOW, J. G. et al. Effects of voluntary activity and genetic selection on aerobic capacity in house mice (*Mus domesticus*). **Journal of applied physiology**, v. 84, n. 1, p. 69–76, 1998.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 109–122, 2012.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TURNIS, M. E. et al. Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. **Immunity**, v. 44, n. 2, p. 316–329, 2016.

VAZQUEZ, F. et al. PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 287–301, 2013.

VICTOR, C. T. et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immunemechanisms in cancer. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 373–377, 2015.

VOGEL, V. G. Breast cancer prevention: a review of current evidence. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 50, n. 3, p. 156–70, 2000.

WENES, M. et al. Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. **Cell Metabolism**, v. 24, p. 1–15, 2016.

WILLIAMS, R. T. et al. Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. **Nature medicine**, v. 22, n. 12, p. 1402–1410, 2016.

WISLØFF, U. et al. Cardiovascular Risk Factors Emerge After Artificial Selection for Low Aerobic Capacity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5708, p. 418–20, 2005a.

WISLØFF, U. et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5708, p. 418–20, 2005b.

WOJEWODA, M. et al. Running performance at high running velocities is impaired but V'O₂max and peripheral endothelial function are preserved in IL-6^{-/-} mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–10, 2014.

WOLFF, G. et al. Exercise modulates redox-sensitive small GTPase activity in the brain microvasculature in a model of brain metastasis formation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–8, 2014.

WORKMAN, P. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **British journal of cancer**, v. 102, n. 11, p. 1555–77, 2010.

World Health Organization - Physical activity. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs385/en/>>.

YANG, S. et al. A Novel MIF Signaling Pathway Drives the Malignant Character of Pancreatic Cancer by Targeting NR3C2. **Cancer Res**, v. 76, n. 13, p. 3838–3850, 2016.

ZHOU, W. et al. Cancer-Secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 501–515, 2014.

ZHOU, W. et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. **Nature cell biology**, v. 17, n. 2, p. 170–182, 2015.

8 ANEXOS

Anexo 1. Cópias das aprovações (e adendos) no CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Of. CEUA/1714/EEFE/031214

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, **aprovou ad-referendum** o Protocolo de Pesquisa nº 2014/08 – Contribuição da atividade física aeróbia voluntária sobre os mediadores da caquexia induzida pelo câncer em camundongos.

Solicitamos a observância da apresentação do relatório parcial em fevereiro de 2016 e relatório final da pesquisa em fevereiro de 2017.

Atenciosamente,

Edilamar Menezes de Oliveira
Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira
Coordenadora

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Patrícia Chakur Brum

Av. Professor Mello Moraes, 65
CEP 05508-030 – São Paulo – SP – Brasil
Fone/fax: 55 11 3091-3097

ESCOLA DE
EDUCAÇÃO FÍSICA
E ESPORTE
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

USP

Of.CEUA/1315/EEFE/21122015

Senhor (a) Coordenador (a)

O Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo aprovou ad referendum da CEUA, em 21 de dezembro de 2015, a emenda ao Projeto de Pesquisa nº 2015/03 – *Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a expressão myomiRs circulante e muscular em um modelo experimental de câncer de mama*, solicitando utilização de mais 30 camundongos fêmeas, da linhagem MMTV PYMT. O referido projeto é desenvolvido pelo pesquisador João Lucas Penteado Gomes e está sob sua responsabilidade.

Atenciosamente

Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires
Coordenador da CEUA

Imo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Edilamar Menezes de Oliveira
EEFEUSP

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E
ESPORTE

Of. CEUA/0116/EEFE/29022016

Senhor(a) Coordenador(a)

O Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de fevereiro de 2016 referendou a emenda ao Projeto de Pesquisa nº 2015/03 – *Efeito do treinamento físico aeróbico sobre a expressão myomiRs circulante e muscular em um modelo experimental de câncer de mama*. Desenvolvido pelo pesquisador João Lucas Penteado Gomes, desenvolvido sob sua responsabilidade.

Atenciosamente

Prof. Dr. Guilherme Giannini Artol
Vice-Coordenador

Imo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Edilamar Menezes de Oliveira
EEFEUSP

Av. Professor Mello Moraes, 65
Cep 05508-030 – São Paulo – SP – Brasil
Fone/fax: 55 11 3091-3067

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Caracterização da função cardíaca em modelo de caquexia induzida pelo câncer: efeitos da atividade física voluntária**”, registrada com o nº 115/16, sob a responsabilidade de **Patricia Chakur Brum e Larissa Gonçalves Fernandes**, apresentado pelo Programa Fisiopatologia Experimental - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 09.11.16

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-07-2016 Término: 01-07-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/C6
Nº de animais	40
Peso/Idade	2-3 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério UNIFESP

CEUA-FMUSP, 09 de Novembro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

XXXII Reunião Anual

03 A 06 DE SETEMBRO DE 2017

Certificado

MENÇÃO HONROSA

Certificamos que o trabalho 17.017 - CONTRIBUIÇÃO DA APTIDÃO AERÓBIA SOBRE A RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL - Tobias GC, Gomes JLP, Fernandes LG, Alves CRR, Almeida NR, Chammas R, Brum PC, Departamento de Biodinâmica do Corpo Humano - USP Centro de Investigação Translacional de Oncologia - USP foi contemplado com MENÇÃO HONROSA durante a XXXII Reunião Anual da FeSBE, realizado de 03 de setembro de 2017 a 06 de setembro de 2017 na cidade de Campos do Jordão Convention Center em Campos do Jordão - SP.

Código de Autenticação: 7e8db05773e7dd5boe480179e7a350e44422b16e

Comissão Organizadora