

TASSIANA MARINI

Efeitos da variação de frequência e intensidade de exercício físico em biomarcadores de carcinogênese colônica experimental, na expressão de ciclooxigenase-2 e em parâmetros séricos de estresse oxidativo

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

Área de Concentração: Patologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Marini, Tassiana

Efeitos da variação de frequência e intensidade de exercício físico em biomarcadores de carcinogênese colônica experimental, na expressão de ciclooxigenase-2 e em parâmetros séricos de estresse oxidativo, 2009.

78 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto

1. Exercício episódico. 2. Câncer de cólon. 3. 1-2-dimetil-hidrazina.
4. Estresse oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tassiana Marini

Efeitos da variação de frequência e intensidade de exercício físico em biomarcadores de carcinogênese colônica experimental, na expressão de ciclooxigenase-2 e em parâmetros séricos de estresse oxidativo.

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.
Área de Concentração: Patologia Experimental

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

As pessoas mais importantes da minha vida...

Meus pais José Milton e Olinda,

Pessoas brilhantes que estão ao meu lado sempre. São os meus exemplos de união, amor, dignidade e coragem. Papai um exemplo de honestidade e disciplina; um homem e pai modelo, no qual me espelho sempre. Mamãe um mulher que de tanto lutar na vida parece que se tornou imune a todos os obstáculos; mãe protetora, amorosa e acima de tudo grande educadora. Se eu herdei apenas um pouquinho de tudo que vocês são hoje então me considero uma grande mulher. Obrigada por tudo que sou, e por tudo que ainda serei graças ao amor e educação que me deram.

Meus irmãos Vinícius, Helen e Miltinho,

A vocês que sempre estiveram comigo em todas as minhas escolhas; que apenas com o olhar me enchiam de segurança e me davam força para seguir adiante. Vinícius um exemplo de garra e determinação; fico toda envaidecida quando as pessoas dizem o quanto somos parecemos. Helen uma mulher encantadora, uma mãe excepcional, e uma eterna amiga; sempre busquei ser como ela. Miltinho um homem forte e muito corajoso, foi meu exemplo de gentileza e honestidade; crescer ao seu lado foi essencial para eu ser como sou e ter coragem de superar todos os desafios. Muito obrigada a todos vocês!

Deus me presenteou com essa linda família quando nasci. Eu os amo mais do que qualquer coisa nesse mundo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

“A nobreza em sua expressão de trabalho atrai para si a nobreza dos que estão em sua volta.”

Autor Desconhecido

A sua sabedoria e experiência sempre me surpreende. Em momentos difíceis encontra as melhores palavras de conforto e encorajamento. Agradeço a oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Sinto-me honrada por tê-lo como orientador.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Por ser o responsável por tudo que existe em minha vida. Obrigada por este presente que agora me ofereces. Obrigada por tudo que vi, ouvi e aprendi. Obrigada pela vida!

A toda minha família,

A todos vocês que me apoiaram e que de uma forma ou de outra sempre me incentivaram a continuar em frente. Vocês são a pilastra que me sustenta e seus ensinamentos sempre trilharam o meu caminho.

Ao meu namorado Flavio,

Você soube compreender a minha ausência, meu isolamento nas horas infindáveis de estudo, a dedicação e o compromisso com os meus ideais. Obrigada meu amor por todo esse apoio e incentivo, e por me fazer sorrir mesmo nos momentos de ansiedade. Agradeço também toda sua família por me acolher com muito carinho dentro do seu lar.

Ao meu amigo e mestre José Alexandre Bachur,

Obrigada pelo exemplo de dedicação e competência, por fazer transparecer o que de melhor eu posso oferecer. Agradeço a confiança e a amizade. O Exemplo é a força mais convincente e eficaz que existe, e você é o meu exemplo de um grande mestre.

A Rosângela Orlandin Lopes,

Agradeço a sua amizade, confiança e a sua dedicação como técnica de laboratório. Você me proporcionou grandes momentos de aprendizado e alegria. Este trabalho não seria possível sem seu apoio e competência.

A minha amiga Érica Carolina Campos,

Obrigada por todos os momentos que compartilhamos juntas. Você foi mais que uma amiga, foi uma irmã que sempre estive ao meu lado quando mais precisei. Agradeço o companheirismo, a força e o carinho.

Ao meu amigo Vinícius Kannen,

A sua amizade sincera tornou mais fácil o meu caminho até essa conquista. Obrigada por compartilhar comigo momentos de aflição e alegria. Agradeço todo seu conhecimento e competência para me ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

A minha amiga Régia Carolina,

O pouco tempo de convivência constante me fez enxergar o quão especial você é. Obrigada pela companhia e pela alegria em todas as horas.

Aos amigos do Laboratório de Oncopatologia: Patrícia Modiano, Aline, Jean, Luisiane, Cleverson, Fernando, Célia, João,

Obrigada pela amizade, pelo auxílio em momentos de dúvidas e pelos vários momentos de descontração. Sem a ajuda de todos vocês este projeto não teria se tornado realidade. Serei sempre grata por tudo que me proporcionaram.

Aos amigos do Departamento de Patologia: Mara, Cristiane, Cristina, Cibele, Élder, Viviane, Patrícia Monteiro, Karina,

Estamos todos unidos por um objetivo em comum, e isso nos possibilitou as trocas de experiência e dúvida. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos nos momentos de trabalho e suas alegrias nos momentos de descontração. A afinidade nos uniu e tenho um profundo carinho e respeito por todos vocês.

Às minhas grandes amigas: Aline, Marisa, Marina, Sheila e Joyce,

Amigas para os momentos de alegria e tristeza, irmãs de coração. Agradeço todas vocês pela amizade sincera, companheirismo e por toda alegria das noites inesquecíveis do “macarrão”. Vocês são pessoas essenciais em minha vida.

Às técnicas Deise Lúcia e Auristela,

Obrigada pelo carinho, disponibilidade e interesse em me auxiliar. A dedicação e experiência de vocês contribuíram muito a este trabalho.

Às Secretárias do Departamento de Patologia: Rosângela, Camila, Neide e Edna Pio (*in memorian*),

“Pode-se viver no mundo uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e amar, trabalhar pelo que se ama e amar aquilo que se trabalha”. A competência e dedicação de vocês tornaram esse sonho possível. Agradeço tudo que fizeram por mim e já agradeço por tudo que ainda farão.

Aos Funcionários do Departamento de Patologia: Toninho, Diraci, Beatriz, Sirlene, Paulo, Jeferson e Henrique,

Pessoas especiais que merecem meu agradecimento por serem capazes de se dedicarem a manutenção e bom funcionamento do nosso local de trabalho. Agradeço simplesmente pelo sorriso transparente todas as manhãs.

A CAPES

A grande financiadora de desse estudo. Obrigada.

“O homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter.”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Listas	xi
Resumo	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Exercício Físico Episódico	2
1.1.1 Exercício Físico Episódico e Câncer	4
1.2 Câncer de Cólon	5
1.2.1 Modelo Experimental de Câncer de Cólon	7
1.3 Exercício Físico e Câncer de Cólon	8
1.3.1 Modelo Experimental de Exercício Físico	13
2 OBJETIVO	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Considerações Gerais	17
3.2 Delineamento Experimental	17
3.2.1 Preparo do Carcinógeno Químico	19
3.2.2 Adaptação à Água	21
3.3 Coleta e Processamento dos Tecidos	22
3.3.1 Focos de Criptas Aberrantes (FCAs)	23
3.3.2 Imunohistoquímica	23
3.3.3 Análise Bioquímica	24
3.4 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Estado Geral dos Aanimais	26
4.2 Índice de Proliferação Celular – PCNA-Li	28
4.3 Focos de Criptas Aberrantes – FCAs	29
4.4 Níveis de Ciclooxygenase-2 (COX-2)	29
4.5 Biomarcadores de Estresse Oxidativo	32
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	46
REFERENCIAS	47
ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Apresentação esquemática das múltiplas etapas do processo carcinogênico, assim como as estratégias de prevenção pelo exercício físico	8
Figura 2: Possíveis mecanismos de proteção contra carcinogênese colorretal pelo exercício e atividade física	9
Figura 3: Escala crescente de intensidades de exercício durante protocolo de natação de 20 minutos baseada nas concentrações de lactato sanguíneo	14
Figura 4: Sequência fotográfica dos procedimentos e o material utilizado para confecção dos pesos referentes à intensidade da natação	19
Figura 5: Delineamento experimental dos grupos experimentais durante as 8 semanas	20
Figura 6: Gráficos do desempenho dos animais dos grupos exercitados com carga 6% durante todo o período de treinamento	26
Figura 7: Índices de proliferação celular do cólon dos grupos experimentais	27
Figura 8: Representação do número de focos de criptas aberrantes nos grupos experimentais submetidos a DMH	28
Figura 9: Representação dos índices de ciclooxigenase-2 nas células epiteliais do cólon nos grupos experimentais	29
Figura 10: Imagens ilustrativas da mucosa colônica	30
Figura 11: Representação dos níveis sorológicos de vitamina E nos grupos experimentais	31
Figura 12: Representação dos níveis sorológicos de malondialdeído nos grupos experimentais	32
Figura 13: Representação dos níveis sorológicos de glutatona reduzida nos grupos experimentais	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais	17
Tabela 2: Protocolo detalhado dos grupos treino que praticaram exercício físico 5 dias/semana	18
Tabela 3: Peso corporal inicial e final, e taxa de crescimento de todos os grupos experimentais	26

RESUMO

MARINI T. Efeitos da variação de frequência e intensidade de exercício físico por em biomarcadores de carcinogênese colônica experimental, na expressão de ciclooxigenase-2 e em parâmetros séricos de estresse oxidativo. 2009. Dissertação (Mestrado). Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

O risco de desenvolver câncer de cólon é reduzido por apropriados níveis de exercício físico. No entanto, os efeitos da variação de frequência e intensidade do exercício são poucos conhecidos. Nosso objetivo foi de analisar os efeitos de diferentes frequências e intensidades de exercício na carcinogênese do cólon em ratos tratados com 1-2 dimetilhidrazina (DMH). Ratos Wistar machos foram divididos 5 grupos com 18 animais em cada grupo: Grupo sedentário (S), exercício episódico leve (EL), exercício episódico intenso (EI), exercício treino leve (TL), exercício treino intenso (TI). Cada um desses grupos foi subdividido em grupo com injeção de 1-2-dimetilhidrazina (D) e grupo sem tratamento (controle). O exercício foi realizado por natação 60 minutos e 20 minutos um dia na semana (exercício episódico) e 5 dias na semana (exercício treino), durante 8 semanas. Após o sacrifício, o soro foi coletado para análise do estresse oxidativo (malondialdeído-MDA, glutatona reduzida-GSH, vitamina E). O cólon distal foi processado para avaliar a formação de focos de criptas aberrantes (FCA), a imunistoquímica para avaliação da proliferação celular (através do PCNA) e a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2). Os níveis séricos de GSH foram reduzidos em todos grupos que praticaram exercício físico sem o tratamento com DMH, exceto o grupo TI. Os níveis de MDA foram diminuídos no TL, e os níveis de vitamina E apresentaram redução no EID quando comparado com o TID. Quando comparado ao grupo SD, o número de FCA foi diminuído no grupo TLD; e os grupos de exercício TLD, ELD e EID apresentaram uma atenuação do aumento da proliferação celular induzida pelo DMH e apenas o grupo TLD apresentou atenuação da expressão de COX-2. Nós concluímos que (1) o exercício treino leve foi altamente efetivo na redução nos biomarcadores da carcinogênese de cólon e isso pode ser devido a atenuação da expressão de ciclooxigenase-2 no cólon e não ao estresse oxidativo sistêmico; (2) o exercício episódico pode exercer um efeito anti-carcinogênico.

Palavras-chave: exercício episódico, câncer de cólon, 1-2 dimetilhidrazina, estresse oxidativo.

ABSTRACT

MARINI T. **Effects of different frequency and intensity of exercise in biomarkers of colonic carcinogenesis-induced, the expression of cyclooxygenase-2 and serum parameters of oxidative stress.** 2009. Dissertation (Master Science Degree). Department of Pathology – School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, 2009.

The risk for colon cancer is reduced by appropriate levels of physical exercise. However, the effects of frequency and intensity of exercise on carcinogenesis are little known. Our aim was to study such parameters in the colon carcinogenesis induced by 1-2-dimethylhydrazine (DMH). Wistar rats were divided into five groups with eighteen animals each: Sedentary (S), Light episodic exercise (LE), Intense episodic exercise (IE), Light training exercise (LT), Intense training exercise (IT). Each one of these groups were subdivided into groups with DMH treatment (D) or not (control). The exercise was performed by swimming for 60 min and 20 min once a week (episodic exercise) and 5 times per week (training exercise), during eight weeks. After the sacrifice, the serum was collected for oxidative stress analyses (malondialdehyde-MDA, reduced glutathione-GSH and vitamin-E). The distal colon was processed for analysis of aberrant crypt focus (ACF) formation, and immunohistochemistry for evaluation of cell proliferation (by the PCNA method), and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. The serum levels the GSH were reduced in all the exercise groups without DMH treatment, apart from the IT group. The levels of MDA were decreased in LT, and the levels of vitamin-E were reduced in IED compared to ITD group. When compared to the SD group, the ACF formation was decreased in the LTD group (67,9%); the exercise groups LTD, LED and IED presented an attenuation on the DMH-induced increase in cell proliferation (55,5%, 16,2%, 31,8%, respectively) and the LTD was the only group to present an attenuation of the DMH-induced increase in COX-2 expression. We concluded that (1) the light training exercise highly effective in reducing parameters of colon carcinogenesis and this may be related to an attenuation of the expression of cyclooxygenase-2 in the colon and not to systemic oxidative stress; (2) episodic exercise may exert a mild anti-carcinogenic effect.

Keywords: Episodic exercise, colon cancer, 1-2 Dimethylhydrazine, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

Em 2007 o *American College of Sports Medicine* (ACSM) recomendou que todos os adultos americanos realizassem 30 minutos ou mais de atividade física, 5 dias na semana ou 20 minutos de atividade física vigorosa pelo menos 3 dias por semana, o que está associado à prevenção de doenças cardiovasculares, eventos tromboembólicos, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, osteoporose, obesidade, câncer de cólon, câncer de mama, ansiedade e depressão, e ainda poderia, anualmente, contribuir para se evitar 250 mil mortes prematuras por alguma dessas doenças. (PATE *et al.*, 1995; BOOTH *et al.*, 2000; KESANIEMI, 2001). Alguns estudos mostram que o exercício pode diminuir todas as causas de mortalidade e que é um dos fatores determinantes para o bem estar geral, físico e psicológico (LEE, 1995; LEE, 2004; KRUK, 2007). Os possíveis mecanismos que levam à esses benefícios são a melhora do perfil lipídico sanguíneo, da sensibilidade à insulina, diminuição da pressão sanguínea, melhora das condições dos vasos sanguíneos e da proteção contra o desenvolvimento do sobrepeso e obesidade (PATE *et al.*, 1995).

Diferentes definições são encontradas em estudos epidemiológicos que tratam da prática de atividade física. O termo atividade física é definido como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos, resultando em gasto energético, podendo ser categorizado de várias maneiras, como por exemplo, àquela praticada no trabalho ou no tempo de lazer. O termo exercício físico pode ser considerado uma subcategoria da atividade física, pois corresponde a uma atividade física planejada, estruturada e repetitiva, definindo parâmetros de frequência, duração e intensidade (CASPERSEN, POWELL e CHRISTENSON, 1985). Não existem dados na literatura que nomeiem ou caracterizem a atividade física praticada apenas um dia na semana, por isso neste estudo, nomeamos essa

prática de exercício físico como “episódico”, entendendo-se por episódio a prática em situações ocasionais.

1.1 EXERCÍCIO FÍSICO EPISÓDICO

Devido às atividades ocupacionais e rotineiras da população, grande parte das pessoas pratica atividade física ou esportiva prolongada apenas nos finais de semana, passando a ser denominada com o termo coloquial “atletas de fim de semana”. Cerca de 1-3% dos adultos nos EUA com idade entre 45 e 64 anos praticam exercícios episódicos com gastos energéticos que se aproximam dos níveis recomendados pelo ACSM (KRUGER, 2007), dentre eles, 22% praticam uma sessão de atividade física por semana e 78% praticam duas sessões por semana com média de 86 minutos (45 a 135 minutos) de duração (LEE *et al.*, 2004). Estimativas mostram que 39,5% das mulheres e 37,4% dos homens nos EUA se enquadram na prática irregular de exercícios (LIBRETT *et al.*, 2006). Observou-se que os efeitos cumulativos do treinamento nos “atletas de fim de semana” são ligeiramente menores do que aqueles resultantes de sessões mais freqüentes de treinamento de *endurance* com curta duração (KRUGER, 2007), embora não se tenha constatado diferenças significantes do ponto de vista estatístico,. Alguns estudos buscaram correlacionar a prática de exercício episódico (1dia/semana) vigoroso no risco de mortalidade e observaram significativa redução nos índices de mortalidade em geral (LEE *et al.*, 2004) e por doenças cardiovasculares (WISLOFF *et al.*, 2006). Não foram demonstrados benefícios adicionais nos parâmetros cardiocirculatórios com aumento da duração ou no número de sessões de exercícios por semana. Em idosos essa prática reduziu em 40% o risco de mortalidade geral (SUNDQUIST *et al.*, 2004).

Devido ao crescimento no número dos “atletas de fim de semana” na população, estudos investigaram os seus efeitos na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL), bem como nas atividades de enzimas antioxidantes em humanos. CHANG *et al.* (2002) mostraram maior oxidação de LDL em indivíduos que praticavam exercício intenso aos finais de semana, quando comparados com indivíduos sedentários e treinados. No entanto, uma única sessão de 30 minutos de exercício intermitente aeróbico foi efetiva na diminuição da lipemia pós-prandial; sendo insuficiente para gerar mudanças nos níveis de HDL-colesterol (ALTENA *et al.*, 2004). Em estudo recente foi demonstrado que 50 minutos de atividade física 2 dias por semana, associada a instruções semanais para melhora do estilo de vida (dieta e atividade física) em crianças obesas, foi suficiente para levar a redução de fatores de risco para doenças metabólicas como, circunferência da cintura, pressão arterial sistólica e diastólica, e HDL-colesterol (TAK *et al.*, 2007). No entanto, em outro estudo com mulheres de 68,8 anos em média, esta mesma frequência de atividade física promoveu mudanças apenas na frequência cardíaca, não interferindo na pressão arterial e aptidão física (MIURA *et al.*, 2008). MEYER *et al.* (2006) afirmaram que o exercício realizado 2 dias consecutivos por semana (aproximadamente 2,5 horas/semana) não se apresenta menos eficaz para a saúde em comparação com os exercícios realizados várias vezes na semana, com o mesmo gasto energético, pois encontrou-se melhora na frequência cardíaca e no VO₂máx nos adultos que o praticavam. A melhora nestes parâmetros foi similar àquela demonstrada nos que praticavam exercícios 5 vezes na semana (média de 2,5 horas/semana).

A atividade física semanal também tem sido estudada em indivíduos acima de 60 anos com propósito de melhorar a qualidade de vida e as habilidades funcionais dessas pessoas, que já possuem limitações fisiológicas no organismo. Idosos que praticaram exercício uma vez por semana tiveram aumento nas habilidades funcionais (WERLE and

ZIMBER, 1999; OURANIA *et al.*, 2003; TAAFFE, 2006), força (DIFRANCISCO, 2007), flexibilidade, na área de secção transversal dos músculos da coxa mensurados por tomografia computadorizada (MARIJKE *et al.*, 2006), além de diminuição dos índices de quedas e fraturas (TAAFFE *et al.*, 1999; NITZ and CHOY, 2004; YANO *et al.*, 2006).

Quanto aos aspectos de saúde mental, a atividade física episódica, quando é realizada mesclando-se exercício aeróbio e anaeróbio, está associada à redução no estado de ansiedade de indivíduos jovens, comparados com aqueles que praticaram apenas exercício aeróbio (HALE, 2002), bem como a melhora no estado de humor de idosos (MATSOUKA *et al.*, 2005). SHERRILL *et al.* (1998) mostraram diminuição significativa no risco de distúrbios do sono em população adulta (homens e mulheres) que praticavam atividade física ao menos uma vez na semana.

1.1.1 Exercício Físico Episódico e Câncer

Existem poucos estudos epidemiológicos que correlacione a frequência da atividade física com o risco de desenvolver alguns tipos de câncer. MOORE *et al.* (2008) observaram 3% de redução no risco de câncer de próstata em adolescentes que praticaram exercício físico vigoroso freqüente, quando comparados com aqueles que praticaram uma única vez na semana; contradizendo os resultados apresentados por LIU *et al.* (2000), os quais não observaram associações entre exercício vigoroso realizado 1dia/semana e 5dias/semana no que tange ao risco de câncer de próstata. O risco relativo para câncer de mama é menor naquelas mulheres que praticam exercício pelo menos 1dia/semana comparado com as que não praticam; sendo inversamente proporcional à frequência do exercício praticado (LUOTO *et al.*, 2000).

Poucos estudos experimentais têm sido conduzidos para elucidar os mecanismos dos efeitos dos exercícios episódicos na saúde. SHIMA *et al.* (1994) avaliou que esta modalidade de exercício reduz a incidência de diabetes *Mellitus* não insulino-dependente em ratos. FERREIRA *et al.* (2007) mostraram que uma sessão de exercício leve de curta duração (5-15 minutos) aumenta a capacidade fagocitária de macrófagos teciduais, sem alterar o seu número, permitindo melhoria da função imunológica de ratos. Nenhum estudo foi encontrado sobre esses efeitos na carcinogênese de cólon, sendo necessário se buscar o entendimento de parâmetros de exercício físico episódico, como tipo, duração e intensidade que sejam mais eficazes na prevenção do câncer, já que o número de “atletas de fim de semana” não para de aumentar na população em geral.

1.2 CÂNCER DE CÓLON

O câncer colorretal é um dos mais comuns tumores nos países desenvolvidos e fatores ambientais podem ser responsáveis por 70-80% da incidência (DOLL e PETO, 1981; CORRÊA LIMA *et al.*, 2005).

Em todo o mundo o câncer colorretal mata cerca de 529 mil pessoas a cada ano e as taxas de incidência foram estimadas em 1 milhão em 2002, constituindo 9% dos novos casos de câncer (PARKIN *et al.*, 2005). Apenas o Brasil em 2008 teve 466.730 novos casos de câncer, onde 26.990 são cânceres de cólon e reto (INCA, 2008). A Agência Internacional da Pesquisa contra o Câncer (IARC) estima que 25% dos casos de câncer em todo o mundo são causados devido ao sobrepeso ou obesidade e ao sedentarismo. Para o câncer de cólon, 11% estão atribuídos ao sobrepeso ou obesidade e 13-14% à inatividade física (BIANCHINI *et al.*, 2002).

A carcinogênese do cólon se inicia a partir de alterações do DNA celular resultante de mutações genéticas e/ou epigenéticas, espontâneas ou induzidas por carcinógenos, etapa conhecida como fase de iniciação do câncer. Alterações em genes específicos levam a modificações da resposta dessa célula e uma alteração na relação da célula com seu microambiente, o que eventualmente pode promover uma vantagem proliferativa em relação às células normais. O estágio de promoção do tumor é caracterizado por expansão clonal das células iniciadas, nos quais o seu produto está associado com hiperproliferação, inibição de apoptose, remodelação do tecido e inflamação. Diferente da iniciação, a fase de promoção é reversível desde que retirado o agente promotor (KLAUNING *et al.*, 2000).

Durante a fase de progressão do tumor, as células pré-neoplásicas evoluem para tumores invasivos através das sucessivas expansões clonais, normalmente associadas a alterações na expressão genética e danos adicionais, devido à instabilidade genômica progressiva; esta é uma fase irreversível do câncer de cólon (ROGERS *et al.*, 2008). Esses eventos moleculares estão acompanhados por alterações histológicas que estão presentes em pequenos adenomas ou em eventuais cânceres invasivos, nos quais apresentam anormalidades na arquitetura da cripta, denominadas focos de criptas aberrantes (FCAs) (KHARE *et al.*, 2009). RONCUCCI *et al.* (1991) descreveram a presença dos FCAs em pacientes com polipose adenomatosa familiar e câncer de cólon. Essas lesões podem ser usadas como biomarcadores biológicos que estão envolvidos no processo de carcinogênese do cólon e podem ajudar a determinar o risco de desenvolvimento do câncer (CAMPBELL *et al.*, 2007).

1.2.1 Modelo Experimental de Câncer de Cólon

Um grande número de pesquisadores utiliza carcinógenos químicos para induzem câncer experimental em vários tecidos; eles aumentam a proliferação celular e induz a formação de tumores em uma variedade de órgãos, dependendo da dose, tempo, duração e frequência de administração e sexo do animal (BALISH, 1977). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é bem conhecido como marcador do ciclo celular, e o seu papel na célula depende da sua capacidade de mediar as interações entre proteínas e DNA. Especificamente na cromatina está diretamente relacionada ao acoplamento do DNA replicado com outras funções celulares, tais como a remodelação da cromatina e alterações epigenéticas. É uma proteína frequentemente utilizada como marcador de proliferação celular em estudos que envolvam câncer (NARYZHNY *et al.*, 2008).

A partir de 1967, o carcinógeno químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) tem sido utilizado na indução do câncer intestinal (DRUCKREY *et al.*, 1967). A administração de DMH em ratos leva a metilação do DNA de células epiteliais colônicas (substituição do grupo metil pelo grupo etil) resultando em tumores com o passar do tempo (PORIES *et al.*, 1993). Uma única dose de DMH induz a formação FCAs no epitélio colônico, e ainda mais importante, alguns FCAs são displásicos, uma importante característica precursora ao câncer de cólon (KHARE *et al.*, 2009). Atualmente é o carcinógeno mais usado em modelos animais para estudo detalhado carcinogênese do cólon (RODRIGUES *et al.*, 2002; HOFFMAN-GOETZ, 2003 e BIRD, 2000), para estudar a prevenção de câncer de cólon com exercícios (FUKU *et al.*, 2007; DEMARZO *et al.*, 2008; LUNZ *et al.*, 2008), além de ser uma boa ferramenta para investigar a relação entre focos de criptas aberrantes nesses tipos de câncer (RODRIGUES, 2002).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E CÂNCER DE CÓLON

A associação entre o sedentarismo e o risco de câncer de cólon está bem estabelecida na literatura por estudos epidemiológicos, e a partir 1922 diante da publicação de que o as taxas de mortalidade de câncer decaíam com o aumento da atividade física, novos estudos sobre esta relação não param de surgir (CHERRY, 1922; SILVERTSEN, 1922). ROGERS *et al.* (2008) em uma recente revisão bibliográfica mostraram que o exercício físico moderado praticado regularmente não só pode prevenir o câncer como têm influência em todas as etapas da carcinogênese do cólon (Figura 1). De 29 estudos observacionais que demonstraram dados sobre a dose-resposta do exercício, 25 relataram que uma diminuição do risco de câncer de cólon estava associada com o aumento nos níveis de exercício praticado, aumento em combinação com todos os fatores de duração, frequência e intensidade, ou apenas em um desses parâmetros. (FRIEDENREICH e ORENSTEIN, 2003). A atividade física está associada com uma significativa redução no risco de câncer de cólon em mulheres e parece ser mais fortemente ligada ao câncer de cólon distal (WOLIN *et al.*, 2007). Num estudo frequentemente citado de ADRIANOPOULOS *et al.* (1987) foi encontrado uma diminuição significativa do aparecimento de tumores em ratos exercitados, após receberem injeção intraperitoneal do carcinógeno químico DMH.

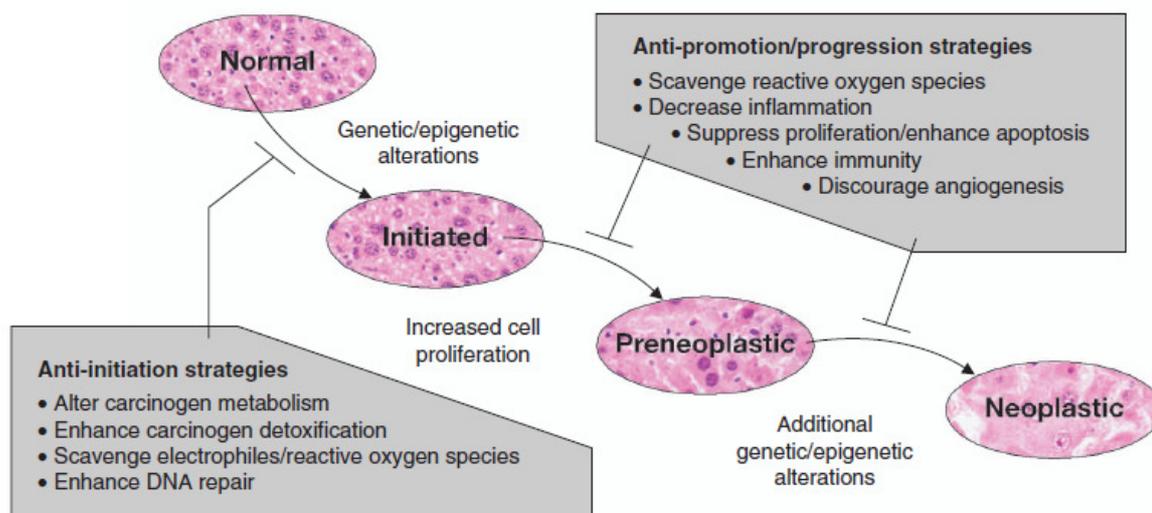


Figura 1: Apresentação esquemática das múltiplas etapas do processo carcinogênico, assim como as estratégias de prevenção pelo exercício físico. O estágio inicial é caracterizado pela conversão de uma célula normal à célula iniciada em resposta a alterações genéticas ou epigenéticas. A conversão de uma célula iniciada à uma população de células pré neoplásicas e finalmente em um tumor é determinado por alterações genéticas ou epigenéticas adicionais que afetam o balanço entre crescimento e morte dessas células. As estratégias de intervenção nesses processos pelo exercício estão listadas nos boxes. (Figura de ROGERS *et al.*, 2008).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito protetor da atividade física contra câncer de cólon, e incluem mudanças no tempo do trânsito gastrointestinal, mudanças no quadro inflamatório crônico, alteração da função imunológica, mudanças nos níveis de insulina e fatores de crescimento semelhante a insulina, alteração nos padrões de mutações genéticas e de estresse oxidativo (HARRIS *et al.*, 2007), níveis de prostaglandinas, mudanças na secreção de ácidos biliares, e níveis de colesterol sanguíneo (GUADRILATERO e HOFFMAN-GOETZ, 2003) (Figura 2).

que parece estar envolvido na obesidade que pode predispor ao câncer de cólon é a atividade inflamatória crônica e assintomática que ocorre na mucosa diante das altas concentrações de gordura (JOHNSON e LUND, 2007).

O exercício e o treinamento físico têm apresentado vários efeitos nos parâmetros imunológicos, tanto funcionalmente como numericamente (NIEMAN *et al.*, 1997). As alterações induzidas pelo exercício no sistema imune são mediadas pelos “hormônios de estresse”, principalmente glicocorticóides e catecolaminas, tendo efeito potencial tanto na inibição quanto na promoção do câncer. O exercício físico regular de intensidade moderada tende a aumentar a proliferação de linfócitos e aumentar o número e a atividade de células “natural killers” (NK) (WESTERLIND, 2003). No entanto, o exercício exaustivo tem sido associado com sintomas de imunossupressão transitória, aumentando a susceptibilidade a infecção (WOODS *et al.*, 1999). Porém, este é o caso particularmente de atletas em jogos competitivos, nos quais estão frequentemente sob influência de estresse físico, psíquico e ambiental, assim como sob nutrição inadequada (ORTEGA, 2008). WANG, CHUNG e CHOW (2009) verificaram uma melhora da citotoxicidade das células NK contra células de carcinoma de orofarínge diante do exercício vigoroso. ORTEGA (2003) verificou uma estimulação de quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos e macrófagos induzidas pelo exercício e em recente estudo o mesmo autor demonstrou que essa estimulação ocorre tanto pelo exercício moderado como pelo exercício intenso, ressaltando que não se pode generalizar no que se diz respeito ao exercício moderado melhorar a função imune e o exercício intenso prejudicá-la, contrariando alguns efeitos supressivos relatados a respeito do exercício intenso em linfócitos e células NK (ORTEGA, 2008). BACURAU *et al.* (2007) demonstraram que o treinamento físico de alta intensidade previne maiores alterações que ocorrem no metabolismo e na função de macrófagos e

linfócitos em tumores de ratos, aumentando a sobrevida dos animais e reduzindo o tamanho do tumor.

A quimiotaxia e a fagocitose são duas importantes funções envolvidas também com a resposta inflamatória. Contudo, enquanto a inflamação desempenha um papel na defesa do organismo, as reações inflamatórias incontroladas são responsáveis pela iniciação e progressão de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, as quais podem causar mutações de genes que controlam o crescimento celular, reparo do DNA e morte celular programada (apoptose), que são chave para o processo oncogênico de proliferação, sobrevida e migração das células respectivamente (BANIYASH, 2006; KAWANISHI *et al.*, 2006). A ciclooxigenase - 1 (COX-1) é uma enzima usualmente expressa em tecidos normais e está envolvida em diversas funções celulares, como na formação de importantes mediadores biológicos (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano) (SHUGI OGINO *et al.*, 2008). A ciclooxigenase-2 (COX-2) é expressa como resposta à presença de mediadores inflamatórios liberados em consequência de vários estímulos nocivos e está envolvida com a proliferação celular. MARTINEZ *et al.* (1999) observaram que pessoas que relataram praticarem uma hora de caminhada ou 30 minutos de corrida por dia tiveram uma diminuição de 28% dos níveis de prostaglandina E₂ na mucosa retal, proteína esta que desempenha um papel na modulação da resposta inflamatória e é um vasodilatador. O aumento nos níveis de prostaglandinas em tumores colorretais foi associado com a progressão do câncer (FURUTA *et al.*, 1988). Em recente estudo observaram alterações na expressão gênica do RNAm das células do cólon de ratos que praticaram exercício físico durante 12 semanas e o exercício físico promoveu alterações dos genes da COX-2 (relacionado à inflamação), Bcl-2 e PPAR γ (relacionados à apoptose), VEGF e HIF-1 α (relacionado à vascularização), porém não foram mudanças tão significativas quanto as que ocorreram no gene ODC-1 (BUEHLMYER *et al.*, 2007). A atividade da ODC-1 é

conhecida por ser hiperexpressa por vários estímulos incluindo ingestão alimentar e alguns hormônios e esta enzima está sendo discutida como um regulador e promotor do crescimento gastrointestinal (SCHIPPER e VERHOFSTAD, 2002). Não existem muitos estudos que correlacionam prática de atividade física, câncer de cólon e alterações genéticas que podem ocorrer, no entanto, um estudo envolvendo adultos com incidência primária de câncer de cólon, mostrou que homens que praticaram exercício físico vigoroso por um longo período (20 anos) tiveram grandes índices de mutações no gene *K-ras* quando comparados com mulheres, o que levou à hipótese de que este aumento tenha ocorrido devido a altos níveis de atividade física praticado por eles. Mutações no gene *Ki-ras* estão presentes em 30-50% dos cânceres de cólon e durante o processo de iniciação do câncer essas alterações sucedem a mutação em APC. (SLATTERY *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo está amplamente associado ao processo de carcinogênese por sua capacidade de causar mutações no DNA e modificações protéicas que podem levar a danos celulares (TANAKA *et al.*, 2000; APOR, 2006), podendo aumentar a proliferação celular no tumor. Diante da presença ou não de carcinógenos químicos, o aumento de radicais livres pode facilitar a inflamação do tecido e com isso aumentar também a liberação de citocinas promotoras tumorais (LEEUWENBURGH *et al.*, 2001). A idéia que fontes endógenas de radicais livres podem ter um papel maior na carcinogênese do que as fontes exógenas (ex. carcinógenos ambientais) têm particular relevância para a pesquisa em torno de exercício físico já que o exercício físico agudo resulta em um aumento no metabolismo e na produção de radicais livres de oxigênio (DAVIES, 1982). O grande consumo de oxigênio durante o exercício, leva há um aumento do influxo de oxigênio para a mitocôndria, e cerca de 2-5% não são completamente reduzidos em água, formando os radicais livres de oxigênio (SJODIN *et al.*, 1990). Ao mesmo tempo, o exercício físico regular reduz o risco de vários tipos de câncer, sugerindo que possa seu ter adaptações

fisiológicas que ocorram em resposta ao longo tempo de exercício, como a produção de moléculas antioxidantes, que previnem os danos oxidativos ao DNA.

1.3.1 Modelo Experimental de Exercício Físico

A natação parece ser um comportamento natural de roedores, considerada menos estressante para este modelo animal, simulando de forma mais adequada situações semelhantes que ocorrem com humanos (LIU *et al.*, 2006). Está bem estabelecida na literatura os efeitos da natação praticada 5 dias/semana, 60 minutos por dia (NUNES *et al.*, 2008; LEME *et al.*, 2009; CAVALCATE *et al.*, 2004), no entanto, muitos estudos que envolvem natação são controversos no que diz respeito a intensidade do exercício, pois denominam o esforço como sendo leve, moderado ou intenso, sem indicar parâmetros que nos levem a essa denominação. É muito comum o uso de diferentes intensidades através de porcentagens do peso corporal dos animais em protocolos de natação. Em um estudo foi avaliado diferentes intensidades de exercício nos índices de lactato do sangue de ratos Wistar sedentários e observaram que os animais mantiveram uma estabilidade na liberação e remoção de lactato no sangue durante 20 minutos de natação suportando uma carga referente a 6% do seu peso corporal. Cargas acima de 6% provocaram um desequilíbrio entre produção e remoção do lactato sanguíneo. Foi considerado desta forma a carga de 6% do peso corporal total em protocolo de natação correspondia a uma carga submáxima de esforço (GOBATTO *et al.*, 2001). Baseado nos dados oferecidos por esses autores pode-se chegar a algumas conclusões em relação à intensidade do esforço durante a natação, que será demonstrado na figura 3.

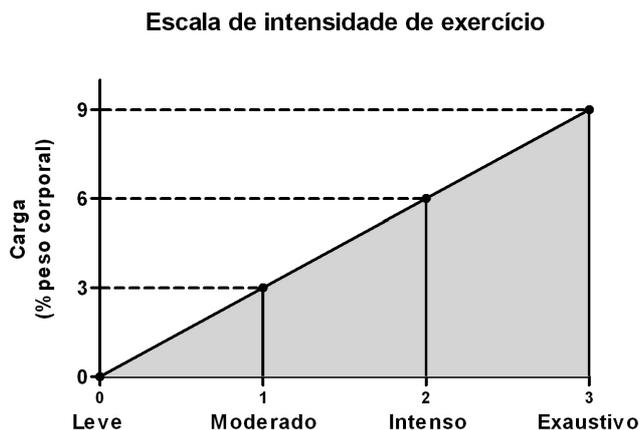


Figura 3: Escala crescente de intensidades de exercício durante protocolo de natação de 20 minutos baseada nas concentrações de lactato sanguíneo descrito por Gobatto *et al* (2001).

O melhor entendimento dos mecanismos biológicos que relacionam o exercício físico e o câncer; uma mensuração mais fidedigna da atividade física realizada pela população durante a vida e uma avaliação de todos os fatores ambientais que influenciam o seu aparecimento, são necessários para elucidar o papel protetor da atividade física no seu desenvolvimento, além de levar a uma prescrição específica de exercício para cada tipo de câncer. Finalmente podemos hipotetizar que o conhecimento desses mecanismos poderá fornecer novas pistas para a biologia do câncer, e poderá proporcionar o delineamento para novas políticas preventivas contra essa condição através do exercício físico e adequá-las às condições da vida moderna.

2. OBJETIVOS

Analisar os efeitos da variação de frequência e intensidade do exercício físico em biomarcadores da carcinogênese colônica (proliferação celular epitelial e focos de criptas aberrantes), na atividade inflamatória (através da análise de expressão de ciclooxigenase-2) no cólon e em marcadores séricos de estresse oxidativo, vitamina E, glutathiona reduzida - GSH e malondialdeído - MDA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Foram utilizados 90 ratos Wistar, machos, de aproximadamente 130g no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Pretos, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia, em condições de temperatura ambiente constante e ciclo noite-dia de doze horas. Foram alimentados com dieta padrão Purina® para ratos, com composição aproximada (g/100g): de proteína 21,0; gordura 3,5; carboidratos 60,0; sais 5,3; complexo vitamínico 2,0 e cinzas (dados fornecidos pelo produtor); e água de torneira *ad libitum*. Esta dieta prevê aproximadamente 3,5 Kcal/g. Os animais foram acomodados em número de quatro por caixa, e todo o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (protocolo n° 009/2009 – Anexo).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 5 grupos com 18 animais em cada grupo: grupo *sedentário* (S), exercício *episódico leve* (EL), exercício *episódico intenso* (EI), exercício *treino leve* (TL), exercício *treino intenso* (TI) e cada um desses grupos foram subdivididos em grupo sem e com tratamento com 1-2 dimetilhidrazina, caracterizados pelo “D” no final de cada sigla, conforme mostra a Tabela 1. A modalidade de exercício utilizada foi a natação, utilizando protocolos adaptados de BOBILLIER *et al.* (2001), GOBATTO *et al.* (2001) e NUNES *et al.* (2008), que estão descritos em detalhes na Tabela 2. Os animais nadavam em um tanque plástico de aproximadamente 60cm de largura, 65cm de altura e

100cm de comprimento, a uma temperatura de $(34 \pm 1^\circ\text{C})$. Os animais dos grupos exercício com carga foram submetidos a natação com um mini colete confeccionado com chumbinho de pesca, fita adesiva e elásticos, proporcionando uma carga referente a 6% do seu peso corporal total do animal (Figura 4) . Esses coletes foram acoplados ao corpo dos animais logo abaixo das axilas, de forma que não prejudicasse os movimentos (RENNO *et al.*, 2007). O peso corporal foi determinado semanalmente nos grupos sedentários e nos grupos de exercício leve. Nos animais dos grupos de exercício intenso o peso foi determinado diariamente devido à necessidade de ajustar as cargas conforme o programa de exercício. A taxa de crescimento (g/dia) foi calculada subtraindo-se o peso final do animal do peso inicial; esse valor foi dividido pelo número total de dias do experimento. O desempenho dos animais durante as sessões de exercício físico foi avaliado por um único avaliador.

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais.

Grupos	Atividade / Condição			Intensidade (% do peso corporal)		Duração (min/dia)		DMH 125 mg/k
	Sedentário (S)	Episódico (E) 1 dia/sem.	Treino (T) 5 dias/sem.	0% (L) Leve	6% (I) Intenso	20 Min	60 Min	
S	X							
EL		X		X			X	
EI		X			X	X		
TL			X	X			X	
TI			X		X	X		
SD								X
ELD		X		X			X	X
EID		X			X	X		X
TLD			X	X			X	X
TID			X		X	X		X

Tabela 2: Protocolo detalhado dos grupos treino que praticaram exercício físico 5 dias/semana.

Grupos	1ª sem	2ª sem	3ª sem	4ª sem	5ª sem	6ª sem	7ª sem	8ª sem
TL	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
TLD	20min	30min	40min	50min	60min	60min	60min	60min
TI	2%	3%	4%	5%	6%	6%	6%	6%
TID	20min							

Protocolos adaptados de Bolillier *et al.* (2001), Gobatto *et al.* (2001) e Nunes *et al.* (2008)

Os animais que receberam injeção intra-peritoneal de DMH receberam uma dose única da droga a uma concentração de 125 mg/kg, segundo protocolo de McLellan (1991) duas semanas após o início do protocolo de exercício (Figura 5).

3.2.1 Preparo do Carcinógeno Químico

O carcinógeno químico Symetrical Dimethylhydrazine Dihydrochloride (Sigma Co) foi diluído em água destilada. A DMH foi armazenada em geladeira em frascos devidamente identificados. Foi preparada em poucas quantidades por motivos de segurança e com os pesquisadores equipados adequadamente, utilizando aventais, máscaras, luvas e gorros. Após a manipulação da droga, os frascos utilizados foram imersos em solução saturada de permanganato de potássio que é uma solução neutralizante, e o restante do carcinógeno não utilizado foi encaminhado para incineração.



Figura 4: Fotos demonstrando a sequência de procedimentos e o material utilizado pra confecção dos pesos referentes a intensidade da natação. (1) Chumbos de pesca de diferentes tamanhos; (2) os chumbinhos são fixados na fita adesiva; (3) um elástico é colocado junto aos chumbinhos; (4) a fita adesiva é enrolada em todo material e o peso é marcado – 28g representa 6% do peso total de um rato com 467g por exemplo. (5) Local onde o peso é colocado no animal; (6) tanque onde os animais praticavam a natação.

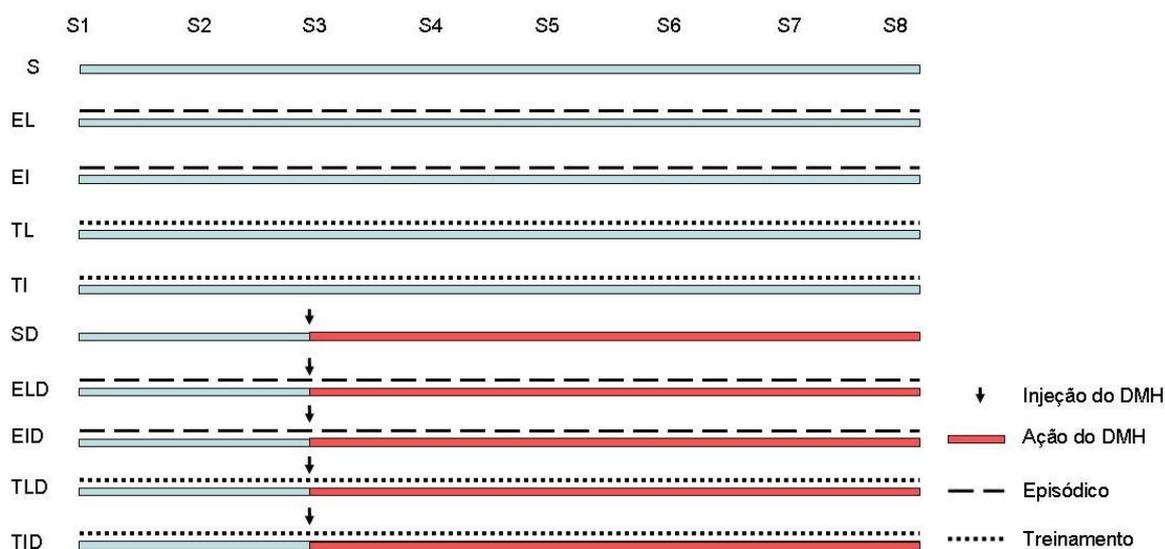


Figura 5: Delineamento experimental durante as 8 semanas: S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso; D = Grupos que receberam injeção de DMH.

3.2.2 Adaptação à água

Todos os ratos dos grupos de natação passaram por um processo de adaptação na água antes de iniciarem os protocolos de exercício estabelecidos. A adaptação ocorreu segundo protocolo adaptado de MANCHADO *et al.* (2006) por 5 dias consecutivos no mesmo tanque plástico onde desenvolveu todo o protocolo de natação e com a mesma temperatura da água. No primeiro dia os animais foram colocados neste tanque com água apenas com 5cm de profundidade por 15 minutos. No 2º dia iniciou um aumento progressivo do nível da água, iniciando em 20cm de profundidade e aumentando 10cm por dia até o 5º dia, onde o nível da água chegou em 50cm. Todos os animais nadaram livremente (sem sobrecarga), pois o propósito desta adaptação foi de reduzir o estresse do animal em relação à água sem promover adaptação fisiológica e/ou treino físico.

3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS

Os animais foram sacrificados na décima semana, contada a partir da semana de adaptação, utilizando a câmara de CO₂ e em seguida 6 animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente para ser submetidos a toracolaparotomia mediana para inventário das cavidades torácicas para coleta do material para estudo. Após a eutanásia o sangue foi retirado por punção cardíaca, coletado através de tubos *BD Vacutainer SST II Advance*® amarelo de 5,0 ml. Foram centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos. O soro foi pipetado e armazenado em tubos de *ependorfs* e congelado em *freezer* a uma temperatura de -70°C.

O cólon foi cuidadosamente isolado e retirado. Foram lavados em salina e abertos longitudinalmente pela borda mesentérica. Cerca de 10 centímetros do cólon distal foi estendido em placas de papelão com a mucosa voltada para cima protegida com papel de seda e submerso em formalina tamponada a 10% por um período mínimo de 24 horas. Após este período, os tecidos foram retirados da formalina, recortados e processados. Já recortadas as peças foram desidratadas por submersão em alcoóis de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) por um período total de aproximadamente 5 horas. Posteriormente para diafanização do material, as mesmas foram submersas em banhos de xilol 100% por aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Em seguida as amostras foram submersas em banhos de parafina líquida em uma temperatura de 60°C por um período de 4 horas, seguindo então para inclusão em blocos, onde parte da amostra foi incluída horizontalmente com a mucosa para baixo, e verticalmente para obtenção de cortes longitudinais e transversais respectivamente. Os blocos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes com 5 µm de espessura; posteriormente foram montados em lâminas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra- corada com

a solução de Eosina Floxina alcoólica por 10 segundos. Para posterior desidratação, a lâmina foi submersa em concentrações crescentes de alcoóis e em seguida diafanizadas em xilol que é meio miscível de Entelan (Merck & Co. Inc, SA) utilizado para montagem das lâminas.

3.3.1 Focos de Cripta aberrante (FCAs)

Após coloração com Hematoxilina e Eosina, foi feita uma análise da mucosa da porção distal do cólon através do exame com lupa adequada, onde os FCAs foram identificados, qualificados, e foi calculada a frequência por unidade de área em cm².

3.3.2 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram feitas em cortes histológicos do cólon através da reação antígeno-anticorpo seguida da reação com marcador visível ao microscópio. As lâminas desparafinadas e hidratadas passaram por um processo de recuperação antigênica através da incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio, e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário para PCNA (Novocastra®, clone PC10) em diluição de 1:100, COX-2 (Novocastra®, clone 4H12) em diluição de 1:200; ambos incubados por 12 horas (*over night*) em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos, seguindo para o polímero conjugado também por 30 minutos, e corou-se com DAB por 1 minuto; todos do *Kit PicTure™ MAX Polymer* (ZYMED®)

Laboratories). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com Entelan para posteriores análises em microscopia de luz. A imunoreatividade foi considerada positiva quando detectada coloração no citoplasma das células para marcação da COX-2 e no núcleo celular para marcação do PCNA. O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número de células fortemente coradas ao longo de cada cripta. Foram contadas 20 criptas por corte, sendo um corte para cada animal.

3.3.3 Análise Bioquímica

Foram necessários 0,5 ml para análise da concentração de MDA no soro, onde foi adicionado 1 ml da solução TBA-TCA-HCL e aquecido por 15 minutos em banho de água fervente. Depois de esfriadas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e utilizado para leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M5) a 535 nm (BUEGE e AUST, 1978).

A concentração de glutatona (GSH) foi avaliada por métodos originalmente descritos por ELMAN (1959) e modificada por HU (1994). Os tióis interagem com ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzóico (DTNB) produzindo cor amarela com pico máximo de leitura a 412nm. Foi adicionado 1 mL de tampão Tris-EDTA (25mmol/L de Tris, 20mmol/L de EDTA, pH 8.2) a 0,025mL de soro, e foi lida a absorbância A1 em espectrofotômetro (SpectraMax M5). Foi então adicionado 0,025mL de DTNB (10mmol/L em metanol absoluto) e, após 15 minutos à temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura (A2). A concentração dos grupos sulfidrilica foi calculada por meio de uma curva padrão de glutatona reduzida (COSTA *et al.*, 2006).

A quantificação de vitamina E no soro dos animais foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) baseada no protocolo de JORDÃO *et al.* (2004). Em 200 µl de soro foram adicionados 100 µl de etanol com 0,125% de BHT e 100 µl da solução de padrão interno, que logo em seguida foi agitado em vortex por 5 segundos. Após a extração foi adicionado 400 µl de hexano e agitado por mais 2 minutos. Centrifugou a 3500 rpm por 5 minutos e foi retirado para outro tubo 200 µl da fase hexânica. Secou-se com fluxo de nitrogênio e ressuspendeu em 200 µl de fase móvel. Para quantificação utilizou a razão entre a área do analito (vitamina) e a área do padrão interno e a concentração foi calculado por meio de um padrão externo de alfa tocoferol.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando o software *Graph Pad Prism 5.0* (San Diego, Califórnia). Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para identificar o padrão de normalidade das amostras. Para verificar as diferenças entre as médias dos grupos para cada variável dependente foi utilizada a Análise de Variância em uma via (One-way) e em duas vias (Two-way) – ANOVA. Foi adotado um nível de significância de 0,05; e a média foi dada \pm erro padrão da média. Quando se verificou diferença entre as médias ($p < 0,05$), foi utilizado pós-teste de Tukey's (One-way) e Bonferroni (Two-way).

4. RESULTADOS

4.1 Estado geral dos animais

O peso corporal inicial dos animais foram em média de $132,0 \pm 1,1g$, e ao final do experimento de $518,8 \pm 10,8g$; não houve diferença estatística entre os pesos e taxa de crescimento dos animais entre os grupos (Tabela 3). Observamos em nosso estudo uma variação dos índices de mortalidade de acordo com o protocolo de exercício utilizado. Tivemos 33,4 % de óbito no grupo EI, 11,2% no grupo EID, e 22,3% nos grupos TI e TID. Podemos observar nesses resultados um elevado índice de mortalidade apenas nos grupos que desenvolveram o protocolo de exercício com carga (6% do peso corporal). A autópsia identificou presença de líquido nos pulmões dos animais, sugerindo um quadro de exaustão pela alta intensidade do esforço e por falta de uma resposta adaptativa particular que levou ao afogamento. Os mesmos grupos apresentaram uma queda no seu desempenho no exercício no decorrer das semanas, e essa queda foi visualmente mais expressiva nos grupos que praticaram exercício episódico (1dia/sem.) (Figura 6).

Tabela 3: Peso corporal inicial, final e taxa de crescimento de todos os grupos experimentais.

Grupos	Peso Corporal (g)		Taxa de Crescimento
	Inicial	Final	Corporal (g/dia/rato)
S	130,0 ± 2,6	571,3 ± 28,4	7,61 ± 0,48
EL	126,8 ± 2,6	508,2 ± 52,8	6,57 ± 0,87
EI	132,0 ± 1,7	521,8 ± 12,8	6,56 ± 0,20
TL	139,1 ± 3,9	517,9 ± 29,9	6,52 ± 0,42
TI	131,9 ± 3,1	545,6 ± 24,6	7,13 ± 0,42
SD	136,7 ± 5,2	474,6 ± 24,5	5,82 ± 0,36
ELD	131,9 ± 3,0	524,0 ± 29,8	6,76 ± 0,52
EID	131,6 ± 3,0	571,6 ± 15,7	7,58 ± 0,24
TLD	131,7 ± 2,9	489,6 ± 14,7	6,17 ± 0,23
TID	127,9 ± 1,3	492,8 ± 8,8	6,29 ± 0,14

Os dados são a média ± o erro padrão da média. n = 6

Desempenho dos animais que praticaram exercício (min/sem)

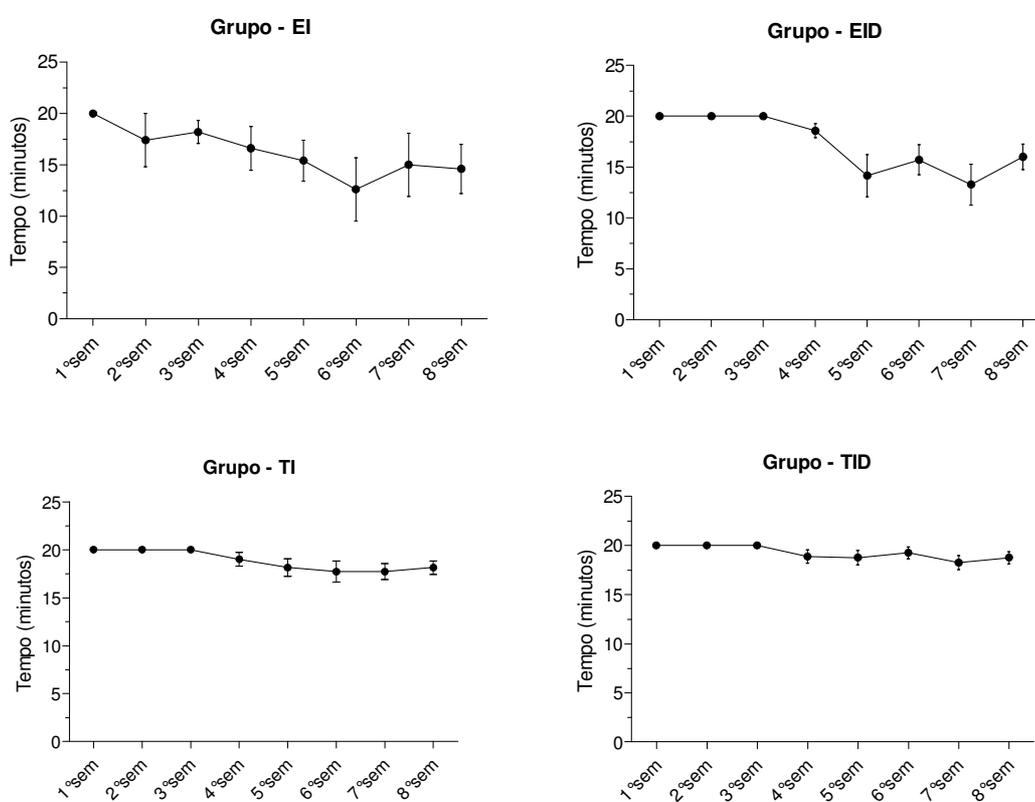


Figura 6: Gráficos do desempenho dos animais dos grupos exercitados com carga 6% durante todo o período de treinamento. EI = Exercício Episódico Intenso, EID = Exercício Episódico Intenso com DMH, TI = Exercício Treino Intenso, TID = Exercício Treino Intenso com DMH. n = 6. Média ± EPM.

4.2 Índice de proliferação celular (i-PCNA) nas células epiteliais do cólon

A aplicação do carcinógeno químico levou a um aumento da proliferação das células epiteliais do cólon demonstrado pela marcação positiva de PCNA (Figura 10A). No entanto, uma significativa atenuação no aumento de i-PCNA diante do carcinógeno foi identificada em todos os grupos que praticaram exercício físico ($p < 0,001$) (Figura 7). Esta atenuação foi mais expressiva no grupo *treino leve* (TLD), demonstrando um i-PCNA similar ao grupo *sedentário* sem DMH (S). O grupo que praticou exercício *episódico intenso* (EID) mostrou menor i-PCNA comparado com o grupo *treino intenso* (TID).

Os grupos que não receberam aplicação de DMH responderam de uma forma diferente ao exercício quando comparados com os grupos DMH. O exercício aumentou a proliferação celular colônica na ausência do carcinógeno, com exceção do grupo *treino leve* (TL) que mostrou uma tendência a diminuir o i-PCNA, quando comparados com o grupo *sedentário* (S). Houve um aumento significativo do i-PCNA no grupo *episódico intenso* (EI), porém este aumento foi similar ao que ocorreu no grupo *treino intenso* (TI).

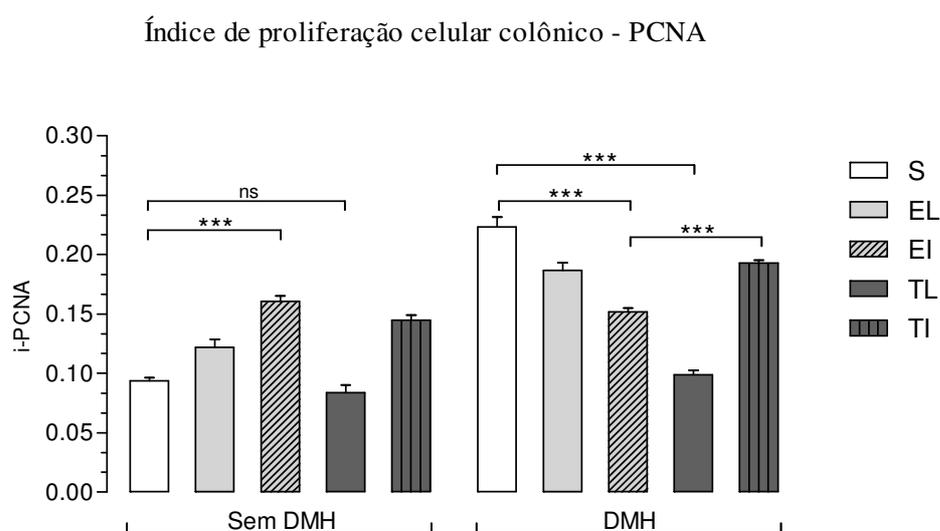


Figura 7: Índices de proliferação celular do cólon dos grupos experimentais. S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso. Primeiro quadrante sem DMH, e segundo quadrante com DMH. $n = 6$; Média \pm EPM. Amostra não-paramétrica, teste estatístico Two-Way ANOVA, pós teste Bonferroni. *** $p < 0,001$; ns = não significante.

4.3 Focos de criptas aberrantes (FCAs)

Foram encontrados FCAs em todos os grupos que receberam o carcinógeno químico DMH (Figura 10C). Houve uma significativa redução nos FCAs no grupo exercício *treino leve* (TLD)($p < 0,001$) e uma tendência a redução no grupo *episódico leve* (ELD) (Figura 8). Diferente dos grupos de exercício leve, os grupos de exercício *intenso* (EID e TID) apresentaram tendências ao aumento de FCAs no cólon dos animais.

Número de focos de criptas aberrantes nos grupos com DMH

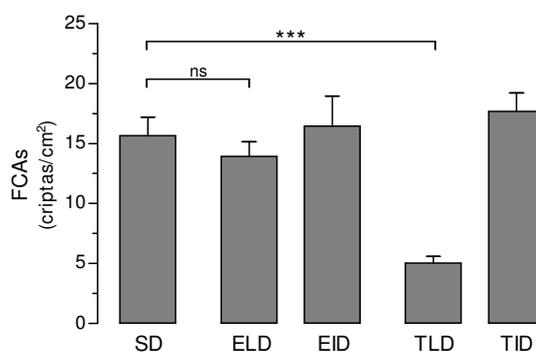


Figura 8: Representação do número de focos de criptas aberrantes nos grupos experimentais submetidos a DMH (D). S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso. $n = 6$; Média \pm EPM. Amostra paramétrica, teste estatístico One-way ANOVA, pós teste Tukey's. *** $p < 0,001$; ns = não significativa.

4.4 Níveis de ciclooxygenase-2 (i-COX-2)

O carcinógeno químico DMH levou a um aumento expressivo no i-COX-2 em todos os grupos independente se sedentário ou exercitado (Figura 10E). A análise estatística apontou uma atenuação significativa dos índices de células marcadas para COX-2 no grupo *treino leve* (TLD)($p < 0,001$) e *treino intenso* (TID)($p < 0,01$) comparado com o grupo *sedentário* (SD), o que não foi evidenciado nos grupos de exercício episódico

(Figura 9). Todos os grupos exercitados que não receberam tratamento com DMH não apresentaram mudanças nos índices de COX-2 quando comparados com o grupo sedentário (S).

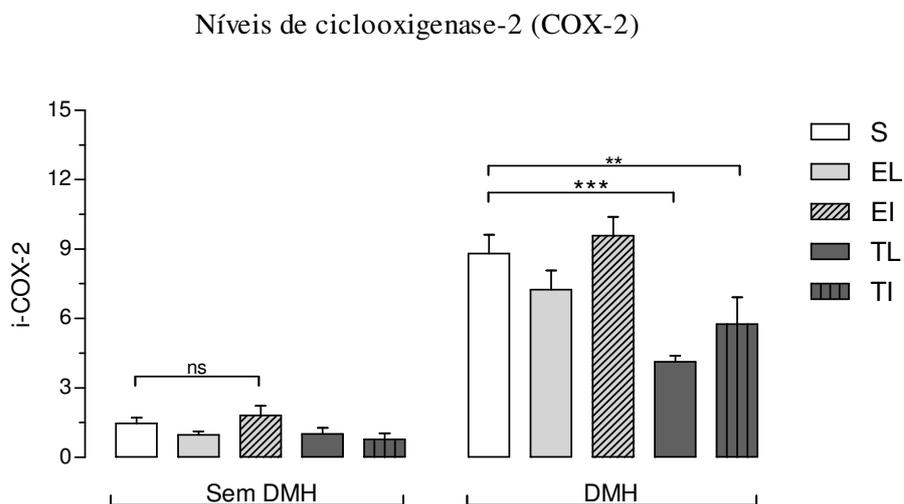


Figura 9: Representação dos índices de ciclooxigenase-2 nas células epiteliais do cólon nos grupos experimentais. S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso. Primeiro quadrante sem DMH, e segundo quadrante com DMH. n = 6; Média ± EPM. Amostra não-paramétrica, teste estatístico Two-way ANOVA, pós teste Bonferroni. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$; ns = não significante.

Imagens ilustrativas da mucosa colônica

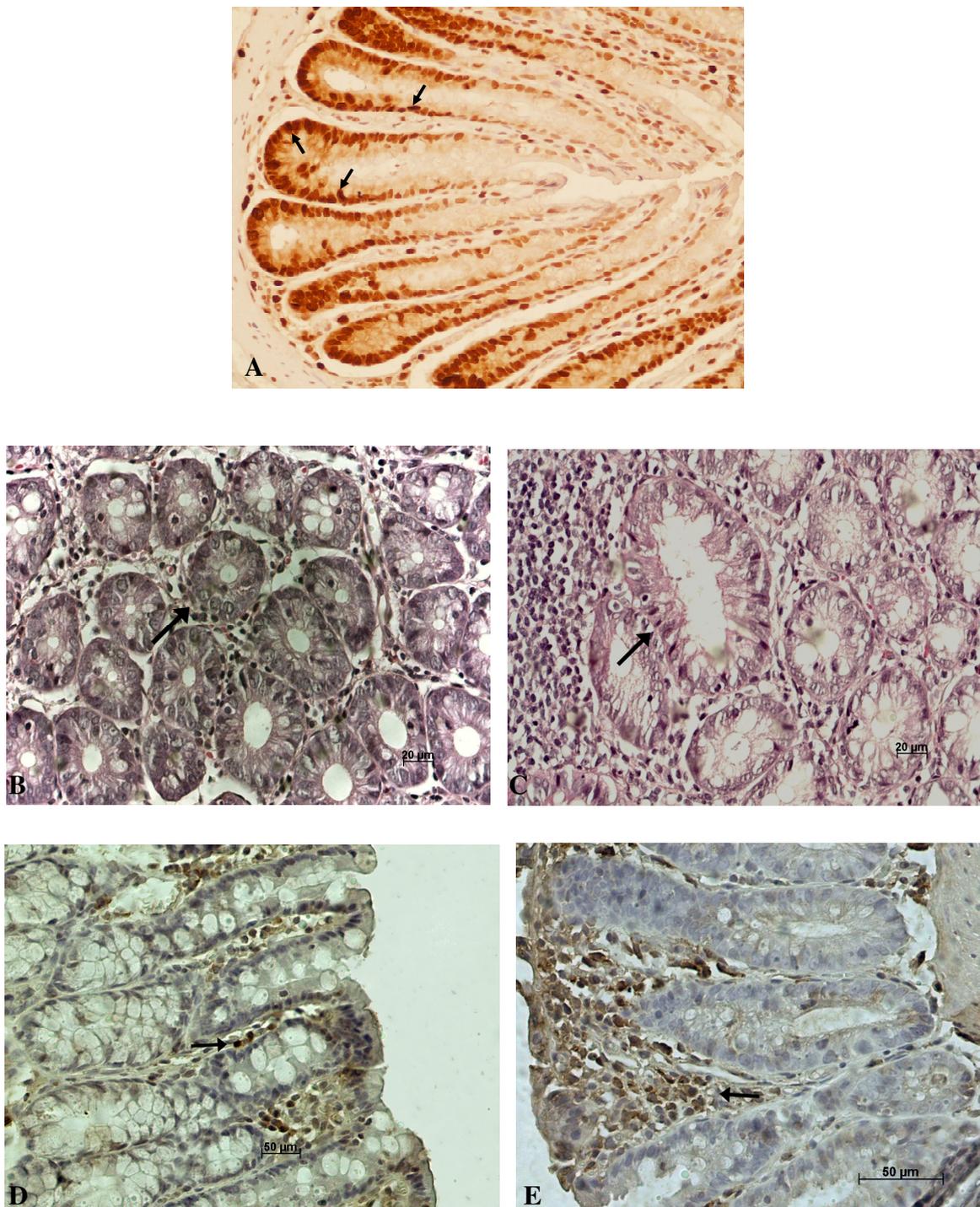


Figura 10: Imagens das criptas colônicas registradas com aumento de 40x. (A) Imunoistoquímica para marcação de antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA, no cólon de animais tratados com dimetil-hidrazina (DMH). (B) Corte histológico corado com Hematoxilina Eosina (HE) demonstrando morfologia normal das criptas colônicas, (C) e a presença de um foco de cripta aberrante após tratamento com dimetilhidrazina. (D) Imunoistoquímica para detecção da presença de ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa do cólon normal, (E) e após tratamento com dimetilhidrazina. As setas apontam células fortemente marcadas para o anticorpo.

4.5 Biomarcadores de estresse oxidativo

O carcinógeno químico DMH não influenciou as concentrações de vitamina E no soro dos animais de uma forma geral. No entanto, os grupos de *exercício treino intenso* tanto sem e com DMH apresentaram um discreto aumento de vitamina E no soro quando comparados com o sedentário (Figura 11), porém não significante. O inverso foi mostrado pelos grupos de *exercício episódico*, que tenderam a reduzir os níveis de vitamina E. Quando comparados com os grupos de *exercício treino* (TLD e TID), o exercício episódico (ELD e EID) mostrou reduzir os níveis de vitamina E, mas apenas o grupo EID apresentou diferença significativa quando comparado com o TID.

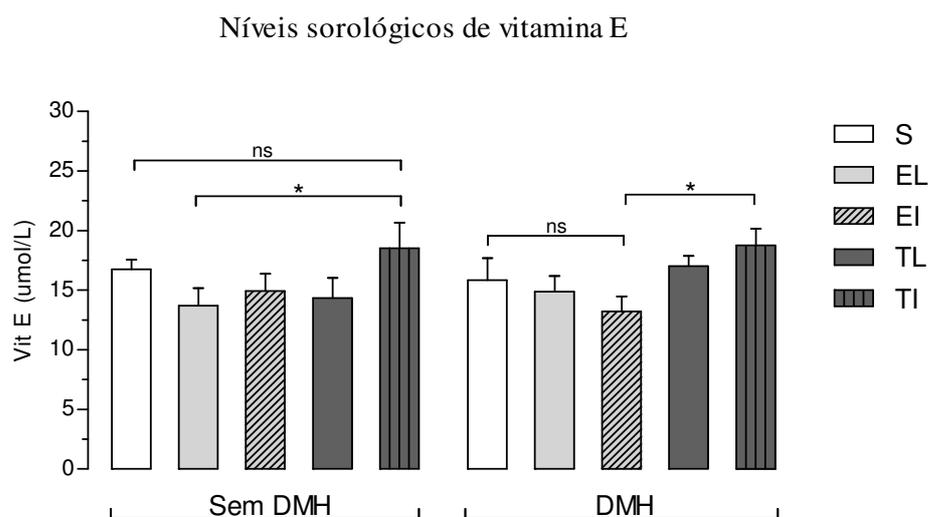


Figura 11: Representação dos níveis sorológicos de vitamina E nos grupos experimentais. S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso. Primeiro quadrante sem DMH, e segundo quadrante com DMH. Amostra paramétrica, teste estatístico Two-way ANOVA, pós teste Bonferroni. Média \pm EPM. * $p < 0,05$.

Em geral, não foi observada alterações nos níveis de MDA nos grupos que receberam DMH (Figura 12). Quando comparados com o grupo sedentário sem DMH os grupos de *exercício treino* (TL e TI) apresentaram uma tendência a redução dos níveis de

MDA, porém esta redução foi significativa apenas no grupo de exercício *treino leve* (TL) ($p < 0,05$).

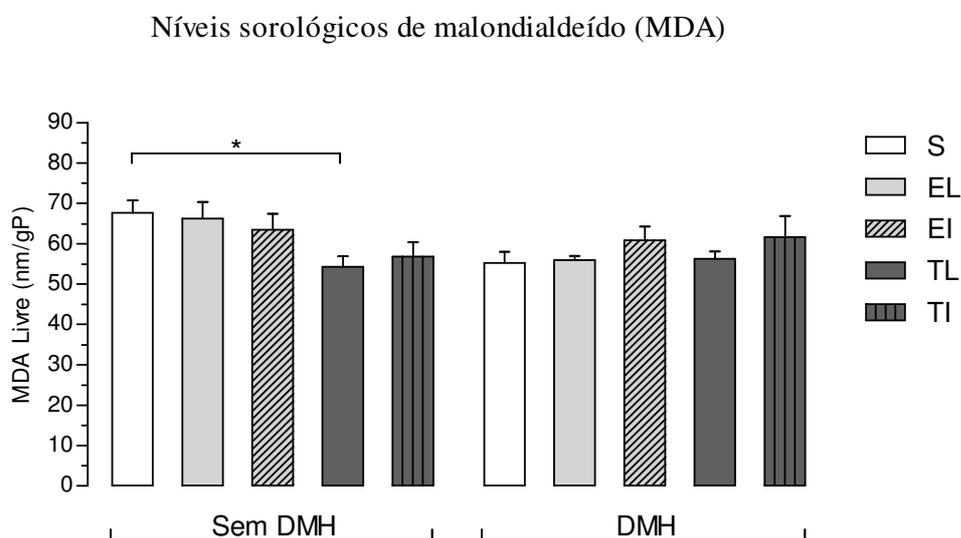


Figura 12: Representação dos níveis sorológicos de malondialdeído nos grupos experimentais. S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso. Primeiro quadrante sem DMH, e segundo quadrante com DMH. Amostra paramétrica, teste estatístico Two-way ANOVA, pós teste Bonferroni. Média \pm EPM. * $p < 0,05$.

O carcinógeno químico DMH não alterou significativamente os níveis séricos de GSH (Figura 13). A prática de exercício episódico associada a ação do carcinógeno mostrou aumentar a GSH de forma significativa no grupo leve (ELD)($p < 0,01$), não apresentando alterações nos demais grupos de exercício. Foi observado que todos os grupos de exercício sem DMH, com exceção do grupo *treino intenso* (TI), apresentaram uma redução significativa no GSH quando comparados com o *sedentário* ($p < 0,05$). O grupo TI manteve as mesmas concentrações de GSH que o grupo *sedentário* (S).

Níveis sorológicos de glutatona reduzida (GSH)

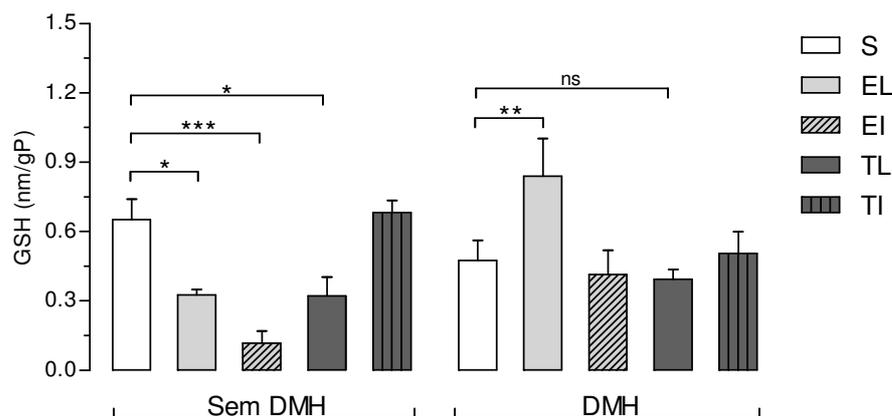


Figura 13: Representação dos níveis sorológicos de glutatona reduzida nos grupos experimentais. S = sedentário, EL = exercício episódico leve, EI = exercício episódico intenso, TL = exercício treino leve, TI = exercício treino intenso. Primeiro quadrante sem DMH, e segundo quadrante com DMH. Amostra não-paramétrica, teste estatístico Two-way ANOVA, pós teste Bonferroni. Média \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = não significante.

5. DISCUSSÃO

O exercício praticado com carga durante este estudo foi considerado intenso baseado no estudo feito por GOBATTO *et al.* (2001) que descreveram a carga de 6% como sendo submáxima tendo como parâmetro o lactato produzido durante o esforço. No entanto, estes autores realizaram uma única sessão de exercício com a carga 6%, diferente de nosso estudo, que adotou esta intensidade para a prática semanal. Desta forma evidenciamos uma queda no desempenho físico e um alto índice de mortalidade nos grupos que praticaram esta intensidade de exercício. Dados similares não foram descritos previamente em estudos que utilizaram natação com carga como modelo de esforço físico em ratos (BOBILLIER *et al.*, 2001; TASSI *et al.*, 1998; SUGIZAKI *et al.*, 2006). Pode sugerir que a queda do desempenho dos animais desses grupos foi devida a intensidade excessiva aplicada, levando-os possivelmente a uma falta de adaptação ao esforço e conseqüentemente a lesões teciduais e restauração incompleta nos níveis de substrato energético entre uma sessão e outra de exercício (GOBATTO *et al.*, 2001). A glicose sanguínea e o glicogênio muscular são essenciais durante a prática de exercício exaustivo prolongado, no entanto a exaustão pode resultar tanto da hipoglicemia quanto da depleção de glicogênio muscular. Já diante de um treinamento físico moderado (cerca de 55-75% do $VO_{2máx}$) há um declínio progressivo da produção de energia a partir do glicogênio muscular e um aumento progressivo da oxidação plasmática de ácidos graxos, promovendo uma maior resistência do organismo ao esforço físico (HOLLOSZY, KOHRT e HANSEN, 1998). FRANCESCONI e MAGER (1983) compararam o desempenho de ratos hiperglicêmicos e hipoglicêmicos submetidos a uma única sessão de exercício físico exaustivo e observaram que os hiperglicêmicos apresentaram um aumento no *endurance*,

no entanto não foi suficiente para prevenir as taxas de mortalidade (50%) encontrada em ambos os grupos.

O exercício e a atividade física já se mostraram em vários estudos como estando diretamente relacionados à diminuição do risco de desenvolvimento de câncer de cólon, embora não seja claro se a proteção é dependente dos fatores que caracterizam o exercício físico (tipo, frequência, duração e intensidade) (HARRISS *et al.*, 2007). Um estudo em humanos demonstrou que homens saudáveis que praticaram em média 250 min/sem de exercício físico de intensidade moderada a intensa tiveram uma diminuição da proliferação celular colônica após 12 semanas, sugerindo que a redução do risco de câncer de cólon nas pessoas que praticam exercício aeróbio em estudos epidemiológicos é devida à redução do potencial proliferativo das células epiteliais (MCTIERNAN *et al.*, 2006). A avaliação da proliferação celular epitelial da mucosa do trato gastrointestinal e a diferenciação anormal dessas células podem apontar anormalidades cinéticas e estruturais envolvidas nos primeiros passos da carcinogênese (NARYZHNY *et al.*, 2008). Em estudo recente com modelo experimental de câncer de cólon e exercício físico similares a este nosso estudo, foi demonstrada atenuação do aumento da proliferação celular no cólon de ratos submetidos ao DMH (DEMARZO *et al.* 2008). Em nosso estudo, todos os grupos que praticaram exercício físico tiveram uma atenuação no aumento da proliferação celular epitelial induzida pelo DMH, no entanto, a atenuação foi mais expressiva no grupo *treino leve* (TLD), confirmando a ação anti-proliferativa do exercício sobre as células colônicas submetidas após injeção do carcinógeno químico. O exercício *episódico intenso* (EID) mostrou ser mais eficaz na atenuação da proliferação celular do que o grupo *treino intenso* (TID). NEUBAUER *et al.* (2008) demonstrou que altas intensidades de exercício e alta frequência podem levar a uma depressão no sistema imune, produção exacerbada de

radicais livres, inflamação sistêmica e a danos oxidativos no DNA, podendo assim levar a maior proliferação celular.

É importante salientar o papel do exercício físico nos índices de proliferação celular na ausência do carcinógeno DMH. Houve um aumento do i-PCNA em todos os grupos exercitados, exceto grupo *treino leve* (TL) que foi o único que demonstrou tendências a redução a proliferação do tecido, e que está de acordo com o que foi descrito anteriormente em humanos (MCTIERNAN *et al.*, 2006). Existem relatos de um aumento dos fatores de crescimento semelhantes á insulina (IGF-1) com o exercício agudo e uma diminuição com o exercício crônico (NGUYEN, 1998; LEME *et al.*, 2009) e estes fatores são mitogênicos que desempenham um papel crucial na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose (YU e ROHAN, 2000); no entanto a relação IGFs e exercício físico não estão bem esclarecidos. Nesse estudo podemos observar que quanto maior foi a proliferação celular nos grupos de exercício sem DMH menores foram as concentrações de GSH no soro, o que pode indicar uma participação direta ou indireta do sistema enzimático antioxidante na regulação da proliferação celular. Em uma revisão bibliográfica os autores mostraram uma íntima relação do balanço entre oxidantes e anti oxidantes no risco de desenvolvimento de cânceres gastrointestinais, correlacionando a presença de COX-2 como marcador inflamatório à perda da função da barreira epitelial, levando assim a maior exposição a agentes oxidantes e a uma maior proliferação celular (BALDASSARRE *et al.*, 2004). Esses dados não foram confirmados em nosso estudo onde não obtivemos mudanças na expressão da COX-2 no cólon nos grupos que praticaram exercício físico sem DMH e mesmo assim o índice proliferativo aumentou, desta forma não podemos correlacionar o índice de COX-2 com o grau proliferativo nos ratos. Agora se tratando dos grupos que receberam injeção de DMH e diante de um processo inflamatório pré existente

gerado pelo carcinógeno, a atenuação do i-COX-2 dos animais do grupo exercício treino leve (TLD) foram proporcionais à atenuação do i-PCNA.

Os FCAs foram inicialmente descritos por BIRD (1987) em cólon de ratos tratados com 1-2 Dimetilhidrazina, e atualmente têm sido postulados com precursores do processo carcinogênico, sendo consideradas lesões pré-neoplásicas, que se desenvolverão em câncer colorretal no decorrer do tempo (MCLELLAN, 1991; BIRD, 1995). A intensidade de 4% do peso corporal de ratos submetidos a natação por longo período foi ineficiente para reduzir a formação de FCAs diante da aplicação DMH (LUNZ *et al.*, 2008). DEMARZO e GARCIA (2004) demonstraram um aumento expressivo nos FCAs após uma única sessão de exercício exaustivo, enfatizando que o exercício pode ter efeito protetor contra o câncer de cólon, como pode aumentar o risco de desenvolvê-la, dependendo do tipo, frequência, intensidade e duração. Pode observar nesse estudo que o exercício treino intenso (5dias/sem. com carga 6%) não demonstrou os mesmos benefícios encontrados nos outros grupos de exercício, apresentando um i-PCNA igual ao grupo controle (SD) e uma tendência ao aumento do número de FCAs. Em contrapartida, o exercício *treino leve* (TLD) foi o mais eficiente na atenuação da proliferação celular, e na redução no número de FCAs no tecido colônico, demonstrando coerência com a redução da proliferação celular encontrada neste mesmo grupo e sustentando resultados descritos recentemente (DEMARZO *et al.*, 2008; FUKU *et al.*, 2007). O primeiro estudo que mostrou os efeitos de diferentes intensidades de natação na carcinogênese não encontrou diminuição nos FCAs após 35 semanas de treinamento (20 min/dia, 5dias/sem., sem carga) (LUNZ *et al.*, 2008), reforçando que a fase do processo carcinogênico e qualquer mudança nos parâmetros do exercício altera as resposta a ele.

Devido a ausência de dados na literatura que indiquem os efeitos do exercício episódico na carcinogênese, os nossos resultados indicam que esta modalidade de exercício

pode gerar alterações na mucosa do cólon e que são dependentes da intensidade que são praticados, pois mesmo na presença do i-PCNA reduzido pelo DMH o grupo de exercício *episódico intenso* (EID) manteve um elevado número de FCAs, diferente do *episódico leve* (ELD) que apresentou uma tendência a reduzir os FCAs, o que pode sugerir uma maior interferência da intensidade do exercício e não da sua frequência, nesses parâmetros.

Embora nosso estudo não constatasse uma diminuição no ganho de peso nos animais, LASKO e BIRD (1995) sugeriram que a prática de exercício físico induzindo a perda de peso e criando um balanço energético negativo inibe a iniciação ou a proliferação de FCA na mucosa do cólon. Pode-se enfatizar, de acordo com os resultados obtidos, que este não é o mecanismo principal do exercício para proteção contra câncer de cólon (WESTERLIND, 2003). O exercício físico em determinada frequência e intensidade parece estar relacionado com um aumento no número e na função de células *natural killers* (NK), nas quais têm um papel fundamental na supressão das células tumorais (MCTIERNAN, 2008). Alguns estudos mostram que a atividade física pode induzir a cascata apoptótica em diferentes tecidos, como no músculo esquelético, músculo cardíaco, e também em células cancerosas (LEUNG, 2003), aumentando a expressão de proteínas pro apoptóticas (caspase-3) (CAMPHELL *et al.*, 2007). É sabido que o exercício físico reduz o tempo de trânsito gastrointestinal diminuindo a exposição da mucosa a carcinógenos químicos presentes no bolo fecal e diminui as concentrações de ácidos biliares (THUNE e LUND, 1996). Todos estes mecanismos associados podem estar diretamente relacionados com a diminuição dos FCAs e proliferação celular encontrado nos grupos exercício (ELD, EID e TLD) e conseqüentemente à prevenção do câncer de cólon pelo exercício.

Diversos estudos demonstram que a expressão de COX-2 no tecido colorretal é normalmente baixa e que sua superexpressão pode alterar o potencial tumorigênico das

células intestinais (DUBOIS *et al.*, 1996), já que a COX-2 é presença marcante na maioria dos cânceres de cólon humanos (SHUGI OGINO *et al.*, 2008). Foi observado aumento da expressão da COX-2 não só em adenocarcinomas, mas também em pólipos de um modelo de polipose adenomatosa familiar em camundongos, onde observaram uma drástica redução dos pólipos intestinais com a inativação da COX-2 (OSHIMA *et al.*, 1996). Nossos resultados condizem com as citações acima, mostrando aumento das concentrações de COX-2 com a aplicação do DMH. Os grupos de exercício treino intenso (TLD e TID) que receberam injeção de DMH mostram atenuar de forma significativa o i-COX-2 quando comparados com o grupo controle (SD), confirmando resultados obtidos por DEMARZO *et al.* (2008), que sugeriram um efeito anti-proliferação do exercício através da inibição da expressão da COX-2 pelo exercício físico. Notoriamente os grupos de exercício *episódico* (ELD e EID) não apresentaram alterações neste marcador inflamatório, permanecendo iguais a SD. Pode-se notar que esta frequência de exercício físico não foi suficiente para gerar alterações sistêmicas que influenciem a inflamação existente no tecido. Neste contexto, ORTEGA (2008) descreve a atuação do exercício intenso no equilíbrio de citocinas pró e antiinflamatórias, enfatizando que os mecanismos nos quais o exercício físico reduz a inflamação crônica não estão bem estabelecidos; mas sabe-se que pode refletir em mudanças em mediadores ou marcadores, como prostaglandinas E2 (PGE2), fator de necrose tumoral - α (TNF α), proteína C reativa e interleucina-6 (IL-6) (HARRISS *et al.*, 2007). Possivelmente o efeito antiinflamatório do exercício físico é dependente de uma relação dose-resposta, já que adultos que praticaram exercício físico em uma maior frequência apresentaram níveis mais baixos de citocinas inflamatórias (IL-6) e maiores de citocinas antiinflamatórias (IL-10) circulantes (WOODS *et al.*, 2009). MARTÍNEZ *et al.* (1999) demonstrou que altos níveis de atividade física leva a uma redução significativa de PGE2 na mucosa retal em adultos não usuários de aspirina ou qualquer outro

antiinflamatório não esteróide, diminuindo a síntese de COX-1 e COX-2. Estudos buscando essa relação têm variado no que diz respeito à duração dos protocolos de exercício, no entanto a maioria dos estudos que encontraram um efeito na modulação dos marcadores inflamatórios pelo exercício físico apresenta durações entre 8 -12 semanas (WOODS *et al.*, 2009).

De acordo com os nossos resultados, podemos destacar que, na ausência de um estímulo inflamatório pré-existente, o exercício físico, nas diferentes frequências e intensidades testadas neste estudo, não induziu aumento da expressão de COX-2 no cólon, mesmo este sendo um órgão altamente sensível ao exercício físico. Nenhum dos protocolos de exercício aplicado neste estudo levou a aumento da expressão de COX-2 na ausência do carcinógeno, o que pode indicar um restabelecimento da mucosa do cólon até o dia de sacrifício (3 dias pós a última sessão de exercício), ou uma incapacidade do protocolo de exercício de gerar inflamação sistêmica que atingisse a mucosa do cólon e perdurasse por 3 dias. Têm sido descrito na literatura que apenas com a prática de exercício exaustivo podem-se observar alterações graves nos parâmetros inflamatórios, imunológicos e até mesmo se gerar isquemia intestinal (MARSHAL, 1998).

A análise bioquímica realizada para avaliar as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) mostraram que a aplicação do DMH alterou os níveis desses marcadores de estresse oxidativo no soro dos animais de forma não significativa, onde observamos uma pequena redução nos níveis de GSH nos grupos que receberam essa droga. Foram encontrados tanto um aumento do GSH (MANJU *et al.*, 2005) quanto uma diminuição (DEVASENA *et al.*, 2006) no soro após aplicação do DMH, indicando que estas concentrações variam com o tempo que o animal é exposto a droga. O GSH é um tiol que exibe propriedades antioxidantes e anticarcinogênica, portanto DEVASENA *et al.* (2006) atribuíram a diminuição de GSH em ratos tratados com DMH ao seu uso aumentado na neutralização da

peroxidação lipídica que ocorre após o uso da droga. O exercício *episódico leve* (ELD) associado ao carcinógeno químico foi a única frequência e intensidade de exercício que levou a um aumento nos níveis de GSH comparado com o grupo *sedentário* (SD). Não existem dados na literatura que justifiquem este achado nesta modalidade de exercício, mas podemos formular a hipótese mais uma vez que a intensidade do exercício praticado e não a frequência no qual ele é realizado é o parâmetro que pode estar envolvido de forma direta nas alterações encontradas.

DAVIS *et al.* (1982) propuseram que o aumento do estresse oxidativo pudesse ser o estímulo inicial para a biogênese mitocondrial em uma situação de treinamento crônico. Essas adaptações incluem alterações na atividade e na expressão genética de enzimas antioxidantes (LEEUWENBURGH *et al.*, 1997; LEEUWENBURGH *et al.*, 2001; RADAK *et al.*, 1999), e são independentes da idade e da dieta consumida (CARLSOHN *et al.*, 2008), o que limita o dano tecidual causado pelos radicais livres (VENDITTI e DI MEO, 1996). Em modelo animal, foi encontrado um aumento de 110% nos níveis de GSH nos ratos saudáveis que praticaram 60 minutos de corrida (esteira) diariamente por 8 semanas quando comparados com o grupo controle (HUSAIN, 2003). Nosso estudo mostrou uma manutenção das concentrações de GSH em níveis iguais ao controle (S) apenas no grupo exercício *treino intenso* (TI), o que pode representar uma adaptação do animal em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo esforço. Os demais grupos de exercício (EL, EI, TL) tiveram as concentrações de GSH reduzidas quando comparadas com o grupo controle (S), o que pode sugerir uma frequência e intensidade de exercício insuficiente para a adaptação ao estresse oxidativo gerado, levando desta forma a uma modificação do perfil antioxidante no sangue (MANNA *et al.*, 2004; WESTERLIND, 2003). Foi considerada coerente a relação dada neste estudo à diminuição na expressão de GSH nestes grupos de exercício com o aumento do PCNA-Li, já que houve um estresse

oxidativo sem adaptação do sistema antioxidante, aumentando a proliferação celular do cólon. SACHECK e BLUMBERG (2001) mostraram que o exercício físico moderado a intenso pode diminuir os níveis de GSH por até 3 dias após a última sessão de exercício em indivíduos jovens treinados. Estes resultados sugerem que o GSH desempenha um papel importante como antioxidante plasmático durante o exercício físico e que suas modificações estão estreitamente relacionadas com a intensidade da atividade física praticada (GAMBELUNGHE, 2001).

Malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica largamente utilizado como marcador de lesões oxidativas geradas por radicais livres de oxigênio nos lipídios das membranas celulares (CIGHETTI *et al.*, 1999). Podem ser considerados agentes carcinogênicos por reagirem com o DNA celular formando aductos (MARNETT, 1999). Houve uma discreta diminuição no MDA nos grupo que receberam o carcinógeno químico DMH, o que já tinha sido relatado por MANJU *et al.* (2005). Esse autor sugere que a diminuição da peroxidação lipídica no cólon de ratos tratados com DMH é devido ao aumento do estímulo proliferativo das células cancerígenas e a sua resistência a lesões geradas pelos radicais livres. As diferentes frequências e intensidades de exercício físico adotadas neste estudo não influenciaram nos níveis de MDA no soro dos animais submetidos ao DMH. Os animais dos grupos *treino* sem DMH (TL e TI) foram os únicos que apresentaram uma redução no MDA, embora apenas o grupo TL reduziu significativamente. Estes dados são coerentes com atenuação da proliferação celular epitelial descrita neste mesmo grupo, demonstrando uma diminuição da ação de radicais livres sobre as membranas celulares. LEAF *et al.* (1997) sugere que o exercício físico induz uma peroxidação lipídica transitoriamente e que existe remoção dos produtos da lipoperoxidação 5 minutos após o término do exercício, o que pode explicar a ausência de

alterações nos demais grupos de exercício em relação ao MDA, já que foi dosado 3 dias após a última sessão de exercício.

Os efeitos antioxidantes da vitamina E ou α -tocoferol é considerado importante para a proteção contra várias doenças incluindo o câncer (HEINONEN *et al.*, 1998), pois impede a peroxidação lipídica induzida por radicais livres e previnem danos ao DNA. Não existem dados na literatura que demonstrem os efeitos da aplicação de carcinógenos químicos nos níveis de vitamina E e nosso estudo não encontrou alterações nos padrões séricos dessa vitamina após a aplicação do DMH. A vitamina E é um antioxidante não enzimático que está disponível em diferentes componentes da nossa dieta, não são produzidos no organismo e em alguns casos de prática vigorosa de exercício são recomendados a suplementação desta vitamina, embora ainda controverso (SACHECK e BLUMBERG, 2001). Encontramos uma tendência ao aumento de vitamina E nos grupos *treino intenso* (TI e TID) e poucos trabalhos na literatura mostram os efeitos do exercício nas concentrações séricas de vitamina E. Contudo dois autores mostraram um aumento desse antioxidante em atletas profissionais após uma competição de ciclismo, sugerindo que esta resposta seja em consequência do aumento do *turnover* lipoproteico, e que o possível mecanismo para este aumento está relacionado com a mobilização de fontes energéticas lipídicas exigidas pelo exercício, e consequentemente a liberação de vitamina E desses tecidos para a circulação (CASES *et al.*, 2006; AGUILO *et al.*, 2005). Embora ocorram grandes diferenças entre estes dois estudos, podemos perceber que o exercício é capaz de mobilizar fontes de vitamina E tanto logo após o exercício como até 3 dias depois de cessado o esforço. O grupo *episódico intenso* (EID) foi o único grupo que apresentou uma redução significativa nos níveis séricos de vitamina E em relação com grupo controle (S), o que sugere um maior consumo durante esta frequência e intensidade de exercício.

De forma geral esses resultados reforçam a hipótese da existência de uma curva dose-resposta na relação entre exercício e câncer de cólon. Confirmam que o exercício físico contínuo de baixa intensidade previne aparecimento de FCAs no cólon de ratos e que o exercício intenso pode apresentar efeitos agravantes na carcinogênese. Enfatiza que há uma resposta positiva do cólon frente ao exercício episódico, sendo necessária maior investigação que enfatize esta modalidade de exercício na prevenção do câncer e de outras doenças crônicas e diante de todas estas observações deve-se ater aos cuidados necessários para a prescrição de exercício físico como parte de um programa de saúde pública.

6. CONCLUSÃO

Foi concluído nesse estudo que: (1) o exercício *treino leve* foi o mais eficaz na redução e atenuação da expressão dos biomarcadores carcinogênicos avaliados, e isso provavelmente é devido a atenuação da expressão da ciclooxigenase-2 no cólon e não a redução de estresse oxidativo sistêmico gerado por ele; (2) o exercício episódico também exerce um discreto efeito anti-carcinogênico em ratos tratados com 1-2-dimetilhidrazina, por estar relacionado a atenuação do aumento de proliferação celular epitelial induzido por carcinógeno químico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILO, A.; TAULER, P.; FUENTESPINA, E.; TUR, J.A.; CORDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiol Behav.** 84:1–7. 2005.

ALTENA, T.S.; MICHAELSON, J.L.; BALL, S.D.; THOMAS, T.R. Single Sessions of Intermittent and Continuous Exercise and Postprandial Lipemia. **Medicine & Science in Sports & Exercise.** 36 (8): 1364-1371, 2004.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Physical activity e public health guidelines; 2007.

ANDRIANOPOULOS, G., R.L. NELSON, C.T. BOMBECK, and G. Souza. The influence of physical activity in 1, 2 dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in the rat. **Anticancer Res.** 7:849 -852, 1987.

APOR, P.; RÁDI, A., Physical exercise, oxidative stress and damage. **Orv. Hetil.,** 4; 147(22):1025-31, 2006.

BACURAU, A.V.N.; BELMONTE, M.A.; NAVARRO, F.; MORAES, M.R.; PONTES, F.L.; PESQUERO, J.L.; ARAÚJO, R.C.; BACURAU, R.F.P. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor-bearing rats. **Exp Biol Med.** 232:1289–1299, 2007.

BALDASSARRE, G.; NICOLOSO, M.S.; SCHIAPPACASSI, M.; CHIMIENTI, E.; BELLETTI, B. Linking inflammation to cell cycle progression. **Curr Pharm Des.** 10(14):1653-66; 2004.

BALISH, R., C. N. SHIH, W. A. CROFT, et al. Effect of age, sex, and intestinal flora on the induction of colon tumors in rats. **J. Natl. Cancer Inst.** 58:1103-1106, 1977.

BANIYASH, M. Chronic inflammation , immunosuppression and cancer: new insights and outlook. **Semin Cancer Biol.** 16(1): 80-8. 2006.

BIANCHINI, F.; KAAKS, R.; VAINIO, H., Weight control and physical activity in câncer prevention. The International Association for the Study of Obesity. **Obesity Reviews,** 3:5-8, 2002.

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters,** v.37, p.147-151, 1987.

BIRD, R.P. Role of aberrant crypts foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters,** v.93, p.55-71, 1995.

BOBILLIER, C.S.; MAUPOIL, V.; JACQUES, L. J.; BERTHELOT, A. Effect of training on metallothionein levels of hypertensive rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise.** May; 33(5): 724-8. 2001.

BOOTH, F.W.; GORDON, S.E.; CARLSON, C.J.; HAMILTON, M.T. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v.88, n.2, p.774-778, fev. 2000.

BUEHLMAYER, K.; DOERING, F.; DANIEL, H.; SCHULZ, T.; MICHNA, H. Exercise Associated Genes in Rat Colon Mucosa: Upregulation of Ornithin Decarboxylase-1. **Int J Sports Med**; 28: 361–367; 2007.

CAMPBELL, K.L.; MCTIERNAN, A., Exercise and Biomarkers for Cancer Prevention Studies. **The Journal of Nutrition**, 137:161S-169S, 2007.

CAMPBELL, K.L.; MCTIERNAN, A.; LI, S.S.; SORENSEN, B.E.; YASUI, Y.; LAMPE, J.W.; KING, I.B.; ULRICH, C.M.; RUDOLPH, R.E.; IRWIN, M.L.; SURAWICZ, C.; AYUB, K.; POTTER, J.D.; LAMPE, P.D. Effect of a 12-month exercise intervention on the apoptotic regulating proteins Bax and Bcl-2 in colon crypts: a randomized controlled trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. Sep;16(9):1767-74. 2007.

CARLSOHN, A.; ROHN, S.; BITTMANN, F.; RAILA, J.; MAYER, F.; SCHWEIGERT, F.J. Exercise increases the plasma antioxidant capacity of adolescent athletes. **Ann Nutr Metab**. 53(2):96-103. 2008.

CASES, N.; SUREDA, A.; MAESTRE, I.; TAULER, P.; AGUILÓ, A.; CÓRDOVA, A.; ROCHE, E.; TUR, J.A.; PONS, A. Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. **Eur J Appl Physiol**; 98:263–269. 2006.

CASPERSEN, C.J.; POWELL, K.E.; CHRISTENSON, G.M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**. Mar-Apr;100(2):126-31; 1985.

CAVALCANTE, W.L.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. Effects of nandrolone decanoate on the neuromuscular junction of rats submitted to swimming. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. Dec;139(4):219-24, 2004.

CHANG, C.K.; TSENG, H.F.; HSUW, Y.D.; CHAN, W.H.; SHIEH, L.C. Higher LDL oxidation at rest and after a rugby game in weekend warriors. **Ann Nutr Metab**. 46(3-4):103-7. 2002.

CHERRY, T.; DEL GIUDICE, M.E.; FANTUS, I.G.; EZZAT, S.; MCKEOWN-EYSSSEN, G.; PAGE, D.A theory of cancer. **Med. J. Aust**. 1:425-438, 1922.

CIGHETTI, G.; DEBIASI, S.; PERONI, R.; ALLEVI, P. Free and Total Malondialdehyde assessment in Biological Matrices by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: What Is Needed for an Accurate Detection. **Analytical Biochemistry**; 266: 222-229; 1999.

CORRÊA LIMA, M.P.; GOMES-DA-SILVA, M.H. Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors. **Nutr Hosp**. Jul-Aug;20(4):235-41. 2005.

COSTA, C.M; SANTOS, R.C.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42; n. 5; p. 345-350; 2006.

DAVIES, K.J.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun** . Aug 31; 107 (4): 1198-205, 1982.

DEMARZO, M.M.; MARTINS, L.V.; FERNANDES, C.R.; HERRERO, F.A.; PEREZ, S.E.; TURATTI, A.; GARCIA, S.B. Exercise Reduces Inflammation and Cell Proliferation in Rat Colon Carcinogenesis. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. Vol.40, No.4, pp. 618-621, 2008.

DEMARZO, P.; GARCIA, S.B. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. **Cancer Letters**. 216 , 31–34. 2004

DEVASENA, T.; MENON, V.P.; RAJASEKHARAN, K.N. Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione during colon carcinogenesis. **Pharmacological Reports**. 58, 229-235; 2006.

DIFRANCISCO-DONOGHUE, J.; WERNER, W.; DOURIS, P.C. Comparison of once-weekly and twice-weekly strength training in older adults. **Brazilian Journal of Sports Medicine**. Jan;41(1):19-22. Oct 24. 2007.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of and cancer: a brief review and analysis. Carcinogenesis 2006 avoidable risks of cancer in the United States today. **J Natl Oct**; 27 (10): 1946-9 **Cancer Inst Jun**; 66 (6): 1191-308, 1981.

DUBOIS, R.N.; RADHIKA, A.; REDDY, B.S.; ENTINGH, A.J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. **Gastroenterology**, v.110, n.4, p.1259-1262, 1996.

DRUCKREY, H.; PREUSSMANN, R.; MATZKIES, F.; IVANKOVIC, S. Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. **Naturwissenschaften**. Jun; 54(11):285-6, 1967.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, p. 70-7, 1959.

FERREIRA, C.K.O.; PRESTES, J.; DONATTO, F.F.; VIEIRA, W.H.B.; PALANCH, A.C.; CAVAGLIERI, C.R. Efeitos agudos do exercício de curta duração sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais em ratos sedentários. **Rev. bras. fisioter.**, São Carlos, v. 11, n. 3, p. 191-197, maio/jun. 2007.

FRANCESCONI, R.; MAGER, M. Hypo- and hyperglycemia in rats: effects on endurance and heat/exercise injury. **Aviat Space Environ Med**. Dec; 54(12 Pt 1):1085-9; 1983.

FRIEDENREICH, C.M.; ORENSTEIN, M.R. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. **J Nutr**; 132(11): 3456S-64S, 2003.

FUKU, N.; OCHIAI, M.; TERADA, S.; FUJIMOTO, E.; NAKAGAMA, H.; TABATA, I. Effect of Running Training on ACF in rat colon. **Medicine & Science in Sports & Exercises**. 2007.

FURUTA, Y.; HALL, E.R.; SANDUJA, S.; et al. Prostaglandin production by marine tumors as a predictor for therapeutic response to in domethacin. **Cancer Res**; 48 (11): 3002-7, 1988.

GAMBELUNGHE, C.; ROSSI, R.; MICHELETTI, A; MARIUCCI, G.; RUFINI, S. Physical exercise intensity can be related to plasma glutathione levels. **Journal Physiol Biochem**; Mar;57(1):9-14, 2001.

GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E.; Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**; Part A 130, 2001.21-27, 2001.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GARCIA, S.C. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. **Quim. Nova**; Vol. 32, No. 1, 169-174, 2009.

HALE, B.S.; KOCH, K.R.; RAGLIN, J.S. State anxiety responses to 60 minutes of cross training. **Br J Sports Med**; 36:105–107, 2002.

HARRISS, D.J.; CABLE, N.T.; GEORGE, K.; REILLY, T.; RENEHAN, A.G.; HABOUBI, N. Physical Activity Before and After Diagnosis of Colorectal Cancer - Disease Risk, Clinical Outcomes, Response Pathways and Biomarkers. **Sports Med**; 37 (11): 947-960. 2007.

HEINONEN, O. P.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P. R.; HUTTUNEN, J. K.; HARTMAN, A. M.; et al. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and betacarotene: Incidence and mortality in a controlled trial. **Journal of the National Cancer Institute**; 90, 440–446. 1998.

HOFFMAN-GOETZ, L. Physical Activity and Cancer Prevention: Animal-Tumor Models. **Meicine & Science in Sports & Exercise**, Vol. 35, No. 11, pp. 1828-1833, 2003.

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 380-5, 1994.

HUSAIN, K. Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats. **Pathophysiology**. 10; 47–56; 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER , Incidência de Câncer no Brasil, Estimativa 2008. Disponível no site: www.inca.gov.br/estimativa/2008

JOHNSON, I.T.; LUND, E.K. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**; Jul 15;26(2):161-81, 2007.

JORDÃO, A.A. JR.; CHIARELLO, P.G.; ARANTES, M.R.; MEIRELLES, M.S.; VANNUCCHI, H. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**; 42(3):459-64. 2004.

KAAKS, R.; LUKANOVA, A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor- I. **Proc. Nutr. Society**. 60:91-106, 2001.

KAWANISHI, S.; HIRAKU, Y. Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation, **Antioxid. Redox Signal**. 8, 1047–1058, 2006.

KESANIEMI, Y.A.; DANFORTH, E.Jr.; JENSEN, M.D.; KOPELMAN, P.G.; LEFEBVRE, P.; REEDER, B.A. Dose-response issues concerning physical activity and health: an evidence-based symposium. **Med. Sci. Sport Exerc**. 33(6 Suppl):S531–S538, 2001.

KHARE, S.; CHAUDHARY, K.; BISSONNETTE, M.; CARROLL, R. Aberrant crypt foci in colon cancer epidemiology. **Methods Mol Biol**.;472:373-86. 2009.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v.19, p. 543-555, 2000.

KRUGER, J.; HAM, S.A.; KOHL, H.W. Characteristics a “weekend warrior”: results from two national surveys. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. May;39(5):796-800. 2007.

KRUK, J. Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: an analysis of the recent evidence. **Asian Pac J Cancer Prev**. Jul-Sep;8(3):325-38. 2007.

LASKO, C.M.; BIRD, R.P. Modulation of aberrant crypt foci by dietary fat and caloric restriction: the effects of delayed intervention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**; 4: 49-55, 1995.

LEAF, D.A.; KLEINMAN, M.T.; HAMILTON, M.; BARSTOW, T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Med Sci Sports Exerc**;29:1036-9. 1997.

LEE, I.M.; HSIEH, C.C.; PAFFENBARGER, R.S. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. **JAMA**. Apr 19;273(15):1179-84, 1995.

LEE, I.M.; SESSO, H.D.; OGUMA, Y.; PAFFENBARGER, R.S. JR. The "weekend warrior" and risk of mortality. **American Journal Epidemiology**. Oct 1;160(7):636-41; 2004.

LEEUWENBURGH, C.; HOLLANDER, J.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFITHS, M.; GORE, M.; JI, L.L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol**; 272:R363-9. 1997.

LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J.W., Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Current Medicinal Chemistry**, 8(7):829-38, 2001.

LEME, J.A.C.A.; SILVEIRA, R.F.; GOMES, R.J.; MOURA, R.F.; SIBUYA, C.A.; MELLO, M.A.R.; LUCIANO, E. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Hormone & IGF Research**. xxx (2009) xxx–xxx.

LEUNG, P.S.; ARONSON, W.J.; NGO, T.H.; GOLDING, L.A.; BARNARD, R.J. Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro. **J Appl Physiol**; 96: 450–454. 2003.

LIBRETT, J.J.; YORE, M.M.; SCHMID, T.L. Characteristics of Physical Activity Levels Among Trail Users in a U.S. National Sample. **Am J Prev Med**. 31(5):399–405; 2006.

LIU, S.; LEE, I.M.; LINSON, P.; AJANI, U.; BURING, J.E. AND HENNEKENS C.H. A prospective study of physical activity and risk of prostate cancer in US physicians. **International Journal of Epidemiology**, 29:1, 29-35; 2000.

LIU, Y.Q.; DUAN, X.L; CHANG, Y.Z; WANG, H.T; QIAN, Z.M; Molecular analysis of increased iron status in moderately exercised rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** 282: 117–123, 2006.

LUNZ, W.; MOREIRA, A.P.B.; VIANA, E.C. Mechanisms of protection against colorectal cancer by exercise and physical activity. **Revista Digital EF y Deportes**. 11; 102. nov/2006.

LUNZ, W.; PELUZIO, M.C.G.; DIAS, C.M.G.C.; MOREIRA, A.P.B.; NATALI, A.J. Long-term aerobic swimming training by rats reduces the number of aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 41: 1000-1004, 2008.

LUOTO R., LATIKKA P., PUKKALA E., HAKULINEN T. AND VIHKO V. The effect of physical activity on breast cancer risk: A cohort study of 30,548 women. **European Journal of Epidemiology**, 16:10, 973-980; 2000.

MACHADO, F.B.; GOBATTO, C.L.; VOLTARELLI, F.A.; ROSTOM DE MELLO, M.A. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**. 31: 731-736. 2006.

MANJU, V.; BALASUBRAMANIYAN, V.; NALINI, N. Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: The effects of dietary luteonin on 1,2- dimethylhydrazin challenge. **Cellular & Molecular Biology Letters**. 10, pp 535 – 551, 2005.

MANNA, I.; JANA, K.; SAMANTA, P.K. Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male wistar rats: protective role of alpha-tocopherol succinate. **Can J Appl Physiol**. Apr;29(2):172-85. 2004.

MARIJKE J.M. CHIN A PAW, MIREILLE N.M. VAN POPPEL, JOS W.R. TWISK, WILLEM VAN MECHELEN. Once a week not enough, twice a week not feasible? A randomised controlled exercise trial in long-term care facilities. **Patient Education and Counseling**; 63; 205–214; 2006.

MARNETT LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat Res.** Mar 8;424(1-2):83-95; 1999.

MARSHALL JC. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses. **Can J Physiol Pharmacol.** May; 76(5):479-84; 1998.

MARTINEZ, M.E.; HEDDENS, D.; EARNEST, D.L.; et al. Physical activity, body mass index, and prostaglandin E-2 levels in rectal mucosa. **J Natl Cancer Inst;** 91 (11): 950-3, 1999.

MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 31, No. 7, pp. 911–922; 2001.

MATSOUKA O., KABITSIS C., HARAHOUSOU Y. AND TRIGONIS I. Mood alterations following an indoor and outdoor exercise program in healthy elderly women. **Percept. Mot. Skills.** 100:3 I, p 707-715; 2005.

MCLELLAN, E.A.; MEDIINE, A.; BIRD, R.P. Sequential Analyses of the Growth and Morphological Characteristics of Aberrant Crypt Foci: Putative Preneoplastic Lesions **Cancer Research** - 51. 5270-5274. October I, 1991.

MCTIERNAN, A. Mechanisms linking physical activity with cancer. **Nature Reviews Cancer.** Mar; 8(3):205-11, 2008.

MCTIERNAN, A.; YASUI, Y.; SORENSEN, B.; IRWIN, M.L.; MORGAN, A.; RUDOLPH, R.E.; SURAWICZ, C.; LAMPE, J.W.; AYUB, K.; POTTER, J.D.; LAMPE, P.D. Effect of a 12-month exercise intervention on patterns of cellular proliferation in colonic crypts: a randomized controlled trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** Sep;15(9):1588-97; 2006.

MEYER, T.; AURACHER, M.; HEEG, K.; URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Does cumulating endurance training at the weekends impair training effectiveness? **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.** Aug;13(4):578-84. 2006.

MIURA, H.; NAKAGAWA, E.; TAKAHASHI Y. Influence of group training frequency on arterial stiffness in elderly women. **Eur J Appl Physiol.** Dec;104(6):1039-44; 2008.

MOORE SC, PETERS TM, AHN J, PARK Y, SCHATZKIN A, ALBANES D, BALLARD-BARBASH R, HOLLENBECK A, LEITZMANN MF. Physical activity in relation to total, advanced, and fatal prostate cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** Sep;17(9):2458-66, 2008.

NAKAMURA Y., TANAKA K., YABUSHITA N., SAKAI T., SHIGEMATSU R. Effects of exercise frequency on functional fitness in older adult women. **Archives of Gerontology and Geriatrics;** 44, 163–173; 2007.

NARYZHNY, S.N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. **Cell. Mol. Life Sci.** 65; 3789 – 3808; 2008.

NEUBAUER O, REICHHOLD S, NERSESYAN A, KÖNIG D, WAGNER KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses? **Exerc Immunol Rev**;14:51-72; 2008.

NGUYEM, U.N.; MOUGIN, F.; et al, Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 78:533-537, 1998.

NIEMAN, D.C. Exercise immunology: practical applications. **Int J Sports Med**; 18:suppl 1: S91-100, 1997.

NITZ J.C. AND CHOY N.L. The efficacy of a specific balance-strategy training programme for preventing falls among older people: A pilot randomised controlled trial. **Age and Ageing**; 33:1; p 52-58; 2004.

NUNES, R.B.; TONETTO, M.; MACHADO, N.; CHAZAN, M.; HECK, T.G.; VEIGA, A.B.G.; DALL'AGO, P. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. **J Appl Physiol**; 104: 1641–1647, 2008.

ORTEGA, E. Exercise end the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, 67 (OCE): E5, 2008.

ORTEGA, E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implication, **Exerc. Immunol. Rev.**, 9:70-93, 2003.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J.E.; KARGMANN, S.L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J.M.; EVANS, J.F.; TAKETO, M.M. Suppression of intestinal polyposis in Apc knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). **Cell**, 87, 803-809. 1996.

OURANIA M., YVONI H., CHRISTOS K. AND IONANNIS T. Effects of a physical activity program. The study of selected physical abilities among elderly women. **J Gerontol Nurs**; 29:7, p 50-55; 2003.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**; 55 (2): 74-108, 2005.

PATE, R.R.; PRATT, M.; BLAIR, S.N.; et al., Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **J. Am. Med. Assoc.** 273:402-407, 1995.

PORIES, S. E., N. RAMCHURREN, I. SUMMERHAYES, and G. STEELE. Animal models for colon carcinogenesis. **Arch. Surg.** 128:647-653, 1993.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic Biol Med** Jul; 27 (1-2): 69-74, 1999.

RENNO, A.C.M.; FAGANELLO, F.R.; MOURA, F.M.; SANTOS, N.S.A.; TIRICO, R.P.; BOSSINI, P.S.; ZUANON, J.A.; NETO, C.B.; PARIZOTTO N.A. The effects of a progressive loading exercise program on femoral physical properties and strength of osteopenic rats. **Acta Ortop Bras.** 15, 5:276-279, 2007.

RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, L.A.G.; SALVADORI, D.M.F.; CAMARGO, J.L.V.; MONTENEGRO, M.R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical of Biological Research** 35: 351-355, 2002.

ROGERS, C.J., COLBERT, L.H.; GREINER, J.W.; PERKINS S.N.; HURSTING, S.D. Physical Activity and Cancer Prevention Pathways and Targets for Intervention. **Sports Med**; 38 (4): 271-296, 2008.

RONCUCCI, L.; STAMP, D.; MEDLINE, A.; CULLEN, J.B.; BRUCE, W.R. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. **Hum Pathol.** Mar;22(3):287-94; 1991.

SACHECK, J.M.; BLUMBERG, J.B. Role of Vitamin E and Oxidative Stress in Exercise. **Nutrition**;17:809–814; 2001.

SCHIPPER, R.G.; VERHOFSTAD, A.A.J. Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. **J Histochem Cytochem**; 50: 1143–1160; 2002.

SHIMA K., SHI K., MIZUNO A., SANO T., IDHIDA K. AND YOSHIMOTO S. Effects of difference in amount of exercise training on prevention of diabetes mellitus in the Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rats, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 23:3, 147-154; 1994.

SHERILL D.L., KOTCHOU K. AND QUAN S.F. Association of physical activity and human sleep disorders. **Archives of Internal Medicine**; 158:17 (1894-1898). 1998.

SHUJI OGINO, GREGORYJ. KIRKNER, KATSUHIKO NOSHO, NATSUMI IRAHARA, SHOKO KURE, KAORI SHIMA, ADITI HAZRA, ANDREW T. CHAN, REIKO DEHARI, EDWARD L. GIOVANNUCCI, AND CHARLES S. FUCHS. Cyclooxygenase-2 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Colon **Câncer. Clin Cancer Res**; 8221 14(24) December 15, 2008.

SILVERTSEN, I.; DAHLSTROM, A.W., The relation of muscular activity to carcinoma: a preliminary report. **Journal of Cancer Res.** 6:365-378, 1922.

SLATTERY ML., ANDERSON K, CURTIN K, MA K, SCHAFFER D, EDWARDS S, SAMOWITZ W. Lifestyle factors and Ki-ras mutations in colon cancer tumors. **Mutation Research.** 483; 73–81; 2001.

SUGIZAKI, M.M.; DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F.; PADOVANI, C.R.; BRUNO, A.; NASCIMENTO, A.F.; ARAGON, F.F.; NOVELLI, E.L.; CICOGNA, A.C. Exercise training increases myocardial inotropic response in food restricted rats. **Int J Cardiol.** Sep 20;112(2):191-201; 2006.

SUNDQUIST, K.; QVIST, J.; SUNDQUIST, J.; JOHANSSON, S.E. Frequent and occasional physical activity in the elderly: A 12-year follow-up study of mortality. **American Journal of Preventive Medicine**; 27:1 (22-27); 2004.

TAAFFE D.R. Sarcopenia - exercise as a treatment strategy. **Australian family physician**. 35:3, 130-134; 2006.

TAAFFE DR, DURET C, WHEELER S, MARCUS R.J. Once-weekly resistance exercise improves muscle strength and neuromuscular performance in older adults. **Am. Geriatr Soc**. Oct; 47(10):1208-14; 1999.

TAK, Y.R.; AN, J.Y.; KIM, Y.A.; WOO, H.Y. The effects of a physical activity-behavior modification combined intervention (PABM-intervention) on metabolic risk factors in overweight and obese elementary school children. **Taehan Kanho Hakhoe Chi**. Oct; 37(6):902-13; 2007.

TANAKA, T.; KOHNO, H.; SHIMADA, R.; KAGAMI, S.; YAMAGUCHI, F.; KATAOKA, S.; ARIGA, T.; MURAKAMI, A.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. **Carcinogenesis**, vol.21, no.6, pp.1183-1189, 2000.

TASSI, E.M.M.; AMAYA-FARFAN, J.; AZEVEDO, J.R.M. Hydrolized alpha albumin as a source of protein to the exercising. **Nutr. Res**. 18, 875-881. 1998

THUNE, I.; LUND, E. Physical activity and risk of colorectal cancer in men and women. **Br J Cancer**. 73 (9): 1134-40. 1996.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **Int J Sports Med**; 18:497-502. 1996.

YANO H., YANG G., WAKAI S., SHIMANUKI H., NAKAJIMA K., HUI G., ISHII K., ZHANG X., NIU K., ONO Y., SAITOU T., HIGASHI Y., MATSUO K., SUZUKI R., HAGA H., TSUJI I. AND NAGATOMI R. Effectiveness of ability grouping in structured fall prevention exercise program for frail elderly people. **Jpn. J. Geriatr**. 43:3 (390-397). 2006.

YU, H.; ROHAN, T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. **J Natl Cancer Inst**. Sep 20;92(18):1472-89; 2000.

WANG JS, CHUNG Y, CHOW SE. Exercise affects platelet-impeded antitumor cytotoxicity of natural killer cell. **Med Sci Sports Exerc**. Jan;41(1):115-22. 2009.

WESTERLIND, K.C., Physical activity and cancer prevention – Mechanisms, **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 35- 11:1834-40, 2003.

WERLE J.; ZIMMER A. Prevention of falls in elderly osteoporotic women: Conception and effects of an intervention program. **Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie**, 32:5, 348-357; 1999.

WISLOFF, U.; NILSEN, T.I.; DROYVOLD, W.B.; MORKVED, S.; SLORDAHL, S.A.; VATTEN, L.J. A single weekly bout of exercise may reduce cardiovascular mortality: how little pain for cardiac gain? 'The HUNT study, Norway'. **European Journal Cardiovasc Prev Rehabil.** Oct;13(5):798-804. 2006.

WOLIN, K.Y.; LEE, I.M.; COLDITZ, G.A.; GLYNN, R.J.; FUCHS, C.; GIOVANNUCCI E. Leisure-time physical activity patterns and risk of colon cancer in women. **Int. J. Cancer:** 121, 2776–2781, 2007.

WOODS, J.A.; DAVIS, J.M.; SMITH, J.A.; NIEMAN, D.C. Exercise an cellular innate immune function. **Med Sci Sports Exerc.**; 31:57-66; 1999.

WOODS, J.A.; VIEIRA, V.J.; KEYLOCK, K.T. Exercise, Inflammation, and Innate Immunity. **Immunol Allergy Clin N Am.** 29, 381–393; 2009.

ANEXO 1 - Reagentes, Soluções, Fixadores e Colorações

A) FORMOL NEUTRO

Foram diluídos 4,0g de fosfato de sódio monobásico, 6,5g de fosfato de sódio dibásico anidro em 900ml de água destilada e 100ml de formol bruto a 37%.

B) SOLUÇÃO DE NaCl 0,9% - SALINA

Foram dissolvidos 9 g de NaCl em 1 litro de água destilada.

C) SOLUÇÃO DE H₂O₂ - 30 vol. 3%

Foram misturados 10ml água oxigenada 30 vol. em 90ml de PBS.

D) COLORAÇÃO HEMATOXILINA HARRIS

Foram misturados 5g de hematoxilina cristais, 50ml de álcool absoluto, 100g alumem de potássio ou amônio, 1000ml de água destilada e 2,5g de óxido vermelho de mercúrio.

E) COLORAÇÃO EOSINA-FLOXINA

Foram misturados 50ml de solução de estoque de eosina a 1%, 5ml de solução estoque de floxina a 1%, 380 ml de álcool a 95% e 2ml de ácido acético glacial.

F) SOLUÇÃO ÁLCOOL-ÁCIDO

Foram misturados 99ml de álcool 70% e 1ml de ácido clorídrico concentrado.

G) SOLUÇÃO PBS

Foram dissolvidos 8,17 g de NaCl, 0,36 g de fosfato de sódio monobásico, 1,05g fosfato de sódio dibásico ajustado e completado para um volume final de 1 litro em água destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 2M.

H) SOLUÇÃO BSA 1%

Foram dissolvidos 0,1g de BSA em 100ml de PBS pH 7.4

I) TAMPÃO CITRATO

Foram dissolvidos 2,1g de ácido cítrico em 1000ml de água destilada. O pH foi ajustado para 6,0 com HCl 1N e NaOH 5N.

J) REAGENTE KCL 1,15%

Foram diluídos 1,15g de KCL em 100ml de água milli Q.

K) REAGENTE TCA-TBA-HCL

Foram dissolvidos 15g de ácido tricloroacético, 0,375g de ácido tiobarbitúrico e 2,08ml de ácido clorídrico a 0,25N em 100ml de água milli Q.

L) SOLUÇÃO ESTOQUE DE α -TOCOFEROL (5mM)

Foi preparada em etanol contendo 0,125% de BHT.

M) SOLUÇÃO EDTA 0,02M

Foram diluídos 7,45g de EDTA a 0,02M em 1000ml de água destilada.

N) SOLUÇÃO TCA 50%

Foram diluídos 50g de ácido tricloroacético em 100ml de água milli Q

O) TAMPÃO TRIS – HCL 0,4M

Foram diluídos 24,228g de TRIS em 500ml de água milli Q. O pH foi ajustado com HCL 6N até atingir 8,9.

P) ÁCIDO DITIONITROBENZÓICO (DTNB) 0,01M

Foram diluídos 0,0198g de DTNB a 0,01M em 5ml de metanol.

Q) GLUTATIONA 0,002M (PADRÃO GSH)

Foram diluídas 0,0061g de GSH em 10ml EDTA a 0,02M. Foi mantida a solução 10 dias em ambiente escuro a 4°C para estabilização.

ANEXO 2 - Número de animais no início e ao final do experimento, e porcentagem da mortalidade de todos os grupos experimentais.

Grupos	n Inicial	n Final	% Morte
S	9	9	0
SD	9	9	0
EL	9	9	0
ELD	9	9	0
EI	9	6	33,4
EID	9	8	11,2
TL	9	9	0
TLD	9	9	0
TI	9	7	22,3
TID	9	7	22,3

ANEXO 3 - Evolução semanal da média dos pesos dos animais até o sacrifício.

MEDIA	sem A	1°sem	2°sem	3°sem	4°sem	5°sem	6°sem	7°sem	8°sem	sacrifício
G01	130,0	179,0	249,1	323,0	381,6	443,6	495,9	519,4	549,0	571,0
G02	131,6	183,0	248,0	279,0	372,4	433,6	489,3	521,6	542,3	571,6
GIAS	136,7	196,7	260,1	315,0	371,4	414,6	442,6	440,3	468,1	474,6
G2AS	139,1	207,9	276,7	313,7	374,0	420,7	458,4	485,4	504,3	517,9
G1A6	126,8	217,8	276,2	327,0	381,8	420,2	453,8	474,6	494,8	508,2
G2A6	131,7	223,7	276,0	320,3	381,6	409,9	435,7	452,3	471,7	489,6
G1BS	131,9	189,6	242,4	294,0	361,9	386,5	449,9	482,5	500,3	524,0
G2BS	131,9	183,9	241,5	293,4	381,1	432,5	478,1	508,5	524,5	545,6
média	127,2	178,8	235,9	263,3	331,2	385,8	402,5	451,1	477,8	492,8

ANEXO 4 - Dados individuais relacionados às concentrações de glutatona reduzida (GSH), vitamina E (Vit E) e malondialdeído livre (MDA L).

Grupos	GSH nm/gP	Vit E umol/L	MDA L nm/gP
S 01	0,4	18,37	59,95
S 02	0,28	19,08	71,39
S 03	0,89	14,64	53,62
S 04	0,65	14,15	76,6
S 05	0,84	19,35	76,42
S 06	0,85	15,7	67,60
SD 01	0,34	26,12	57,2
SD 02	0,65	17,21	50,05
SD 03	0,91	13,02	67,09
SD 04	0,32	15,44	46,26
SD 05	0,28	14,07	61,23
SD 06	0,43	11,36	49,14
EL 01	0,2	14,17	51,7
EL 02	0,41	21,37	58,39
EL 03	0,35	14,54	74,35
EL 04	0,33	12,06	65,44
EL 05	0,35	9,41	62,29
EL 06	0,32	10,76	85,09
ELD 01	1,06	13,65	52,23
ELD 02	0,84	20,44	52,94
ELD 03	0,76	12,17	59,37
ELD 04	1,52	16,55	56,94
ELD 05	0,4	9,42	55,31
ELD 06	0,24	15,21	59,15
EI 01	0	8,26	56
EI 02	0,37	18,07	53,49
EI 03	0,11	14,09	63,39
EI 04	0,01	12,73	61,81
EI 05	0,01	14,09	59,78
EI 06	0,21	18,64	85,88
EID 01	0,59	14,26	59,83
EID 02	0,17	10,9	58,57
EID 03	0,6	11,84	77,49
EID 04	0,31	10,4	58,24
EID 05	0,42	20,21	51,15
EID 06	0,81	12,03	67,76
TL 01	0,27	9,67	59,99
TL 02	0,37	19,21	44,43
TL 03	0,77	13,71	54,28
TL 04	0,23	19,6	48,97

TL 05	0,12	12,36	62,98
TL 06	0,17	17,17	60,02
TLD 01	0,33	17,68	58,06
TLD 02	0,52	16,47	65,94
TLD 03	0,34	21,77	53,83
TLD 04	0,57	15,46	57,85
TLD 05	0,42	10,03	52,19
TLD 06	0,25	15,92	53,88
TI 01	0,52	11,38	64,89
TI 02	0,78	20,81	61,26
TI 03	0,63	17,58	40,05
TI 04	0,48	16,08	59,5
TI 05	0,8	22,54	47,45
TI 06	0,84	27,89	64
TID 01	0,84	18,08	58,35
TID 02	0,82	13,61	88,14
TID 03	0,27	16,3	69,24
TID 04	0,53	17,43	48,13
TID 05	0,28	21,51	53,57
TID 07	0,29	25,18	63,57

“Se eu pudesse deixar algum presente a vocês, deixaria acesso ao sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para vocês, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E quando tudo mais faltasse, um segredo: O de buscar no interior de si mesmo, a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)