

Rodrigo Nunes Cal

**Avaliação da influência da atividade
física aeróbia e anaeróbia na progressão
do câncer de pulmão experimental**

**São José do Rio Preto
2012**

Rodrigo Nunes Cal

Avaliação da influência da atividade física aeróbia e anaeróbia na progressão do câncer de pulmão experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

Co-orientador: Prof. Dr. Kazuo Kawano Nagamine

**São José do Rio Preto
2012**

Cal, Rodrigo Nunes
Avaliação da influência da atividade física aeróbia e anaeróbia na progressão
do câncer de pulmão experimental / Rodrigo Nunes Cal
São José do Rio Preto, 2012
47 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –
FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

1. carcinogênese experimental; 2. câncer de pulmão; 3. atividade física

Rodrigo Nunes Cal

Avaliação da influência da atividade física aeróbia e anaeróbia na progressão do câncer de pulmão experimental

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Maluf Cury

2º Examinador: Prof. Dr. Cassiano Merussi Neiva

3º Examinador: Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção

Suplente: Prof. Dr. Kazuo Kawano Nagamine

São José do Rio Preto, 25 / 05 / 2012.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Introdução	1
Objetivos.....	6
Materiais e Métodos	7
Resultados	13
Discussão	21
Conclusões	26
Referências Bibliográficas	27
Anexo: Artigo Científico	33

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares pelo apoio e incentivo correto oferecido a mim e à Professora Dra. Patrícia Maluf Cury pela oportunidade da realização da pesquisa.

Ao enfermeiro Renato Paceli e ao educador físico Carlos Henrique pelos ensinamentos referentes aos procedimentos práticos experimentais e pelo companheirismo prestado a mim.

Aos funcionários do Laboratório de Performance Humana pela limpeza do local, ao funcionário Pedro do Biotério pela aplicação do carcinógeno nos camundongos, à funcionária Cecília por ter me ensinado as etapas necessárias para a obtenção das lâminas coradas com hematoxilina-eosina e aos funcionários do SVO e da secretaria de Pós-Graduação pela assistência prestada nos momentos solicitados.

Ao Professor Dr. Kazuo Kawano Nagamine pela co-orientação, ao Prof. Dr. Cassiano Merussi Neiva e ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro pela realização da análise estatística.

Aos alunos e professores do curso de Pós-Graduação pelo espírito fraterno praticado, pelas ótimas aulas ministradas, seminários apresentados e pelos materiais didáticos fornecidos, influenciando positivamente no aprendizado de todos.

Às demais pessoas que participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa científica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) camundongos praticando a atividade física aeróbia.....	9
b) camundongos do grupo aeróbio em repouso na água	9
c) indução da prática da atividade física aeróbia.....	10
d) pesos (chumbinhos) presos em linha comum com fita crepe.....	10
e) colocação do peso na cauda do camundongo do grupo anaeróbio.....	10
f) camundongos praticando a atividade física anaeróbia.....	10
Figura 2: a) visualização de nódulos pulmonares macroscópicos e coração.....	11
b) visualização microscópica da hiperplasia pulmonar	11
c) visualização microscópica do nódulo pulmonar	12
Figura 3: Comparação dos pesos médios de cada grupo experimental	13
Figura 4: Progressão do peso nos camundongos	14
Figura 5: Quantidade de nódulos, subtipos nodulares, hiperplasias e de lesões pulmonares totais em cada grupo	19
Figura 6: Comparação da mediana de lesões totais de cada grupo	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número e mediana de nódulos e hiperplasias por grupo e por animal.....	15
Tabela 2: a) Número e padrão histológico de lesões pulmonares (grupo controle)	16
b) Número e padrão histológico de lesões pulmonares (grupo aeróbio).....	17
c) Número e padrão histológico de lesões pulmonares (grupo anaeróbio)	18
Tabela 3: Quantidade de animais de cada grupo que não apresentaram e apresentaram nódulos pulmonares.....	20
Tabela 4: Quantidade de animais de cada grupo que não apresentaram e apresentaram hiperplasias pulmonares	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AFA : grupo aeróbio
2. AFAN : grupo anaeróbio
3. Balb-C : cepa de camundongo
4. °C: graus Celcius
5. Cm : centímetros
6. CO₂ : dióxido de carbono
7. EGFR: receptor de fator de crescimento epidérmico
8. FHIT-1: fator induzido por hipóxia 1-alfa
9. G: gramas
10. HE : Hematoxilina e eosina
11. HER-2: fator de crescimento epidérmico humano 2
12. VIP : Vasoactive Intestinal Peptide
13. VO₂ :Volume de oxigênio absorvido pelo corpo

Resumo

Introdução: O câncer de pulmão é uma das neoplasias mais incidentes no mundo, sendo a principal causa de mortalidade por câncer. Muitos estudos epidemiológicos têm sugerido que a atividade física pode reduzir o risco do câncer de pulmão, outros trabalhos avaliaram a eficácia da utilização da atividade física na supressão, remissão e redução da recorrência de tumores. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da atividade física aeróbia e anaeróbia no desenvolvimento e na progressão do câncer de pulmão experimental. **Material e Métodos:** Os tumores de pulmão foram induzidos com uma dose de 3mg de uretana/kg, em 67 camundongos Balb-C, divididos em três grupos: Grupo 1 - 24 camundongos tratados com uretana e sem atividade física; Grupo 2 - 25 camundongos tratados com uretana e submetidos ao exercício aeróbio em natação; Grupo 3 - 18 camundongos tratados com uretana, submetidos ao exercício anaeróbio em natação com carga gradual de 5 a 20% do peso corporal. Todos os animais foram sacrificados após 20 semanas, e as lesões pulmonares foram analisadas. **Resultados:** A mediana do número de lesões (nódulos e hiperplasias) foi de 3,0 para o grupo 1, 2,0 para o grupo 2 e 1,5 para o grupo 3 ($p = 0,052$). Quando comparado apenas a presença ou ausência de lesão, houve uma diminuição no número de lesões no grupo 3 em comparação com o grupo 1 ($p = 0,03$), mas não em relação ao grupo 2. Não houve metástases ou outras alterações em outros órgãos. **Conclusão:** A atividade física anaeróbia, mas não a aeróbia, diminuiu a incidência dos tumores de pulmão experimental.

Palavras-chave: atividade física, câncer de pulmão experimental, exercício aeróbio e exercício anaeróbio

Abstract

Introduction: Lung cancer is one of the most incident neoplasms in the world representing the main cause of mortality for cancer. Many epidemiologic studies have suggested that physical activity may reduce the risk of lung cancer, other works evaluate the effectiveness of the use of the physical activity in the suppression, remission and reduction of the recurrence of tumors. **Objective:** To evaluate the effects of aerobic and anaerobic physical activity in the development and the progression of lung cancer. **Material and Methods:** Lung tumors were induced with a dose of 3mg of Urethane/kg, in 67 male Balb - C type mice, divided in three groups: Group 1 - 24 mice treated with Urethane and without physical activity; Group 2 - 25 mice with Urethane and subjected to aerobic swimming free exercise; Group 3 - 18 mice with urethane, subjected to anaerobic swimming exercise with gradual loading 5 to 20% of body weight. All the animals were sacrificed after 20 weeks, and lung lesions were analyzed. **Results:** The median number of lesions (nodules and hyperplasia) was 3.0 for group 1, 2.0 for group 2 and 1.5 to 3 ($p = 0.052$). When compared only the presence or absence of lesion, there was a decrease in the number of lesions in group 3 compared with group 1 ($p = 0.03$) but not in relation to group 2. There were no metastases or other changes in other organs. **Conclusion:** The anaerobic physical activity but not aerobic, diminish the incidence of experimental lung tumors.

Keywords: Physical activity, Experimental Lung Cancer, Aerobic exercise, Anaerobic exercise.

Introdução

Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão continua a ser o câncer mais incidente no mundo (12,3% de todos os casos novos de câncer) e também é a causa de morte por câncer mais frequente, apresentando aumento de 2% por ano na sua incidência mundial. ⁽¹⁾ A sobrevida média cumulativa total em cinco anos é de 13% em países desenvolvidos (variando entre 13 e 21%) e de 9% (variando entre 7 e 10%) nos países em desenvolvimento. A média mundial estimada é de 11%. ⁽¹⁻²⁾

As taxas de incidência por câncer de pulmão são, geralmente, mais altas em homens do que em mulheres. Entretanto, tem sido observado que as taxas em mulheres vêm aumentando e as taxas nos homens têm se mantido estáveis, com tendência ao declínio. ⁽³⁾

Dentre as localizações no organismo nas quais o câncer se manifesta, o câncer de pulmão é o que possui a maior malignidade e letalidade, pois apenas 14% dos homens e 18% das mulheres conseguem sobreviver durante 5 anos após o diagnóstico da doença. ⁽⁴⁾

O número de casos novos de câncer de pulmão estimado para o Brasil no ano de 2012, é de 27.320, sendo 17.210 entre homens e de 10.110 nas mulheres. O número de mortes foi de 21.867, sendo 13.677 homens e 8.190 mulheres em 2010. ⁽¹⁾

Já é documentado que o cigarro está diretamente associado ao aumento do risco de câncer de pulmão, laringe, cavidade oral, esôfago, orofaringe, pâncreas, pelve renal, bexiga urinária e estômago, bem como doenças crônicas, como cardiopatias e doenças pulmonares. ⁽⁵⁻⁶⁾ O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer de

pulmão é o fumo. No Brasil, cerca de 90% da ocorrência de câncer de pulmão está ligada ao tabagismo excluindo-se as mortes relacionadas ao fumo passivo. A exposição passiva à fumaça também é capaz de aumentar o risco de câncer de pulmão e cardiopatias. ⁽⁶⁾ As taxas de incidência em um determinado país refletem seu consumo de cigarros.

Modelo experimental

A uretana, um éster etílico do ácido carbâmico, é um carcinógeno amplamente utilizado em estudos de carcinogênese química experimental desenvolvendo, por exemplo, adenocarcinomas em pulmão de camundongos. ⁽⁷⁻⁸⁾

Pode ser administrada por via oral ou injetável, possibilita a produção de tumor em um curto período de tempo. Além disso, apresenta baixa toxicidade, que repercute em uma reduzida taxa de mortalidade de animais.

Em estudos prévios, foi analisado o efeito da poluição atmosférica em relação ao câncer de pulmão, em modelo experimental com camundongos. ⁽⁷⁻⁸⁾

Os tumores em pulmão de camundongos são um importante modelo na pesquisa do câncer. Muitos dos trabalhos que descreveram o desenvolvimento do câncer de pulmão em mamíferos foram realizados com roedores, especialmente com camundongos. ⁽⁹⁾

Esse modelo é adequado levando-se em consideração a rapidez com que o animal desenvolve o câncer, tornando mais fácil a análise das variáveis em estudo e eliminando os outros fatores de confusão encontrados nos trabalhos epidemiológicos. ⁽⁷⁾

Além da contagem do número de nódulos tumorais macroscópicos para a comparação entre os grupos, pode-se também estudar microscopicamente as lesões pulmonares. ⁽⁷⁻⁸⁾

As alterações morfológicas mais precocemente observadas nesse modelo são as hiperplasias e foram detectadas histologicamente com apenas dois meses de experimento. A seguir, observa-se o desenvolvimento de seguida adenomas e carcinomas. As lesões derivam de pneumócitos do tipo II, conforme comprovado por estudo de microscopia eletrônica. ⁽⁸⁾

Um importante estudo detectou a incidência e a multiplicidade do tumor de pulmão em diferentes cepas de camundongos com 14 a 16 semanas de vida após a injeção de 1mg de uretana/g do peso corporal do animal. A incidência do câncer de pulmão foi de 100% nas cepas sensíveis, variou de 60% a 90% nas cepas intermediárias e foi menor que 60% nas cepas resistentes à carcinogênese pulmonar. O número de tumores detectado nas cepas sensíveis variou de 10 a 30 em cada camundongo, nas cepas intermediárias variou de 1 a 9 e nas resistentes foi menor que 1. ⁽¹⁰⁾

O exercício físico de salto e de natação em ratos com tumor de Walker 256 é capaz de combater a caquexia e diminuir a massa tumoral. Além disso, animais que são submetidos ao protocolo de exercícios aeróbios possuem maior concentração de lipoperóxidos em relação ao grupo anaeróbio. ⁽¹¹⁾

Prada e colaboradores analisaram biomarcadores de condicionamento aeróbio e de estresse oxidativo em ratos treinados por natação na intensidade correspondente ao limiar anaeróbio. Os ratos foram adaptados ao meio líquido por 2 semanas, 5 dias/semana em tanques coletivos (100 X 80 X 80 cm) contendo água rasa a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos diários. Na segunda semana, os animais portaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal, atada ao tórax. Para determinar o limiar anaeróbio, os animais foram colocados individualmente nos tanques suportando sobrecarga de 50% do peso corporal (sobrecarga utilizada para provocar hiperlactemia) e exercitaram-se

(saltos) durante 6 minutos (30s de atividade, interrompidos por 30s de repouso). Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício com cargas progressivamente maiores. A carga inicial foi de 4,5% do peso corporal, sendo acrescido de 0,5% a cada 5 minutos, até a exaustão. O treinamento por exercício de natação na intensidade equivalente ao limiar anaeróbio durante 4 semanas foi eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais e reduzir as lesões musculares. ⁽¹²⁾

Atividade Física

O homem contemporâneo utiliza cada vez menos suas potencialidades corporais e o baixo nível de atividade física tornou-se fator decisivo no desenvolvimento de doenças degenerativas. Nessa perspectiva, o interesse em conceitos como atividade física e qualidade de vida vem adquirindo importância, desencadeando a produção de trabalhos científicos e um movimento no sentido de valorizar ações voltadas a adoção de práticas de atividade físicas. ⁽¹³⁾

A atividade física tem sido um dos grandes aliados para a manutenção da conjuntura biopsicossocial na população contemporânea. Também pode ser considerada como uma importante forma preventiva de muitas doenças, além de promover o bem estar físico e mental. ⁽¹⁴⁾

Há diversos mecanismos fisiológicos por meio dos quais a atividade física regular é capaz de reduzir a mortalidade geral, atuar na prevenção primária e secundária de diversas doenças, bem como atuar de modo eficiente como coadjuvante no seu tratamento e na melhora da qualidade de vida. ⁽¹⁵⁾

Há evidências científicas que relacionam a atividade física como um importante meio para a prevenção primária do câncer. Aproximadamente 170 estudos epidemiológicos observacionais de atividade física e risco de câncer em locais

específicos no organismo têm sido realizados. A evidência para um menor risco com o aumento da prática da atividade física é classificada como convincente para o câncer de mama e cólon, provável para o câncer de próstata, possível para o câncer de pulmão e endometrial e insuficiente para todos os outros cânceres. A recomendação de organizações de saúde pública para prevenir o surgimento do câncer é praticar atividade física de intensidade moderada à vigorosa no mínimo 30 min/dia em 5 dias por semana ou mais. ⁽¹⁶⁾

Lee e seus colaboradores realizaram um estudo prospectivo em 13.905 homens que não possuíam câncer de pulmão, com idade média de 58,3 anos. Eles responderam a questionários, tais como a quantidade de cigarros que fumam diariamente e a frequência e a duração da prática de atividade física. Os autores concluíram que a prática da atividade física está relacionada a um menor risco de desenvolver o câncer de pulmão. ⁽¹⁷⁾

O aumento do consumo máximo de oxigênio VO_2 máximo é uma das adaptações mais documentadas em relação ao exercício. É específico para cada tipo de exercício e mediado pela interação entre os sistemas respiratório, cardiovascular e muscular. Há extensa literatura científica associando um maior VO_2 máximo a um melhor prognóstico, particularmente nos portadores de doença coronariana e insuficiência cardíaca congestiva. ⁽¹⁸⁾

Segundo o American Institute for Cancer Research, a atividade física é dita essencial para se ter uma boa saúde. As pessoas que estão ativas durante um longo período de tempo, possuem um menor risco de câncer. Estudos sugerem que em alguns sobreviventes de câncer, o exercício melhora perspectivas de longo prazo e da qualidade de vida e mostram que a fadiga pode ser controlada com um programa de exercício

moderado. O exercício também pode aliviar a depressão e a ansiedade. A atividade física melhora a função do sistema imunológico e pode reduzir estresse, além disso, ajuda a controlar ganho de peso e reduzir a percentagem de gordura corporal. ⁽¹⁹⁻²⁰⁾

No câncer de mama tem-se notado alguma melhora e alguns resultados significativos durante a reabilitação no tratamento e no pós-tratamento do câncer em mulheres mastectomizadas. Em relação ao câncer de pulmão, não existem trabalhos que avaliam os efeitos da atividade física especificamente sobre o desenvolvimento do câncer, mas sabe-se que atividade física pode melhorar o prognóstico através de um efeito benéfico sobre os biomarcadores e o balanço energético, bem como diminuir o risco para doenças cardiovasculares, que é uma importante causa de morte em indivíduos que sobreviveram ao câncer. ⁽¹⁵⁾

Objetivos

Esse projeto pretende avaliar se existe relação entre a atividade física, aeróbia e anaeróbia, e a progressão do câncer de pulmão induzido por uretana em camundongos.

Materiais e Métodos

Após a aprovação do Comitê de Ética, 67 camundongos machos adultos Balb-C foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas em uma temperatura de 23°C +/- 2°C e umidade relativa de 60% e submetidos a 12 horas luz e 12 horas de escuro por dia, com água e ração ad libitum.

No primeiro dia de experimento, 3mg/kg de uretana foi injetada intraperitonealmente em cada camundongo, em duas doses separadas de 1,5mg/kg com 48 horas de intervalo entre elas. Os animais foram divididos em três grupos: grupo 1 - controle, sem atividade física, n = 24; grupo 2 - com atividade física aeróbia, n = 25 e grupo 3 - com atividade física anaeróbia, n = 18.

Como neste modelo o câncer de pulmão não é desenvolvido espontaneamente, não houve necessidade de fazer um grupo controle sem uretana e sem atividade física. Os animais foram pesados semanalmente.

Protocolo de Treinamento

Os camundongos foram submetidos a um programa de treinamento aeróbio, adaptado por Neiva e Mello, 1995. Eles foram colocados em um recipiente de plástico com água a uma profundidade de 40 cm mantida à uma temperatura de 23 +/- 2°C.

Após a injeção da uretana, os camundongos foram submetidos aos protocolos de exercício. O programa de treinamento iniciou com uma semana de adaptação à água, que consistiu em colocar os animais por períodos progressivos de 10 minutos/dia, atingindo 50 minutos no final de 5 dias. A partir da 2ª semana até a 20ª semana, os animais foram então submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio (grupo 2), que consistiu em quatro sessões semanais de 20 minutos cada, em nado livre, cujo tempo

foi aumentado progressivamente à 30min. Foi necessário mover a água para induzir a prática da atividade física aeróbia após algum tempo, porque os animais começaram a descansar na água (figura 1 a, b e c).

O treinamento anaeróbio (grupo 3) consistiu em três sessões semanais de 2 minutos de natação com carga em cada série e 2 minutos de intervalo de descanso entre cada série, havendo uma variação na quantidade de séries realizadas por dia (mínimo: 3 e máximo: 5). A carga foi aumentada progressivamente de 5% a 20% do peso corporal. O modelo de carga foi adaptado com pesos colocados na cauda dos camundongos. Utilizamos uma linha comum na qual foram colocados chumbinhos que foram acoplados na cauda de cada animal, presos por fita crepe (figura 1 d, e e f).

O peso corporal foi medido semanalmente e o aumento de carga foi estimado de acordo com o modelo experimental. Uma carga com mais de 3% do peso corporal é definida como um exercício anaeróbio, enquanto a frequência de três sessões semanais é considerada como um protocolo de treinamento moderado, e quatro sessões semanais é considerada como treinamento pesado. ⁽²¹⁾

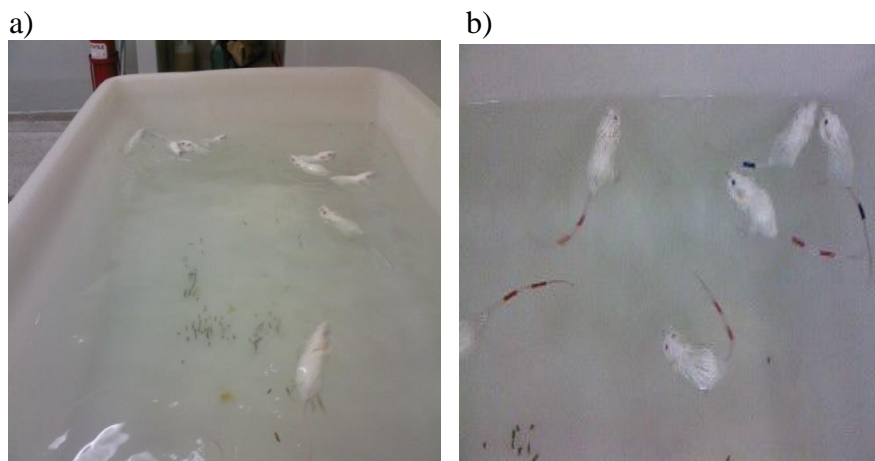
Os pesos de todos os animais foram calculados semanalmente. Os animais praticaram a atividade física anaeróbia durante 5 dias com a carga de 5% (3 séries/dia de 2min), 11 dias com a carga de 10% (5 séries/dia de 2min), 17 dias com a carga de 15% (4 séries/dia de *2min durante 4 dias e 5 séries/dia de *2min durante 13 dias) e 13 dias com a carga de 20% (5 séries/dia de *2min). O asterisco redigido ao lado do tempo 2min significa que alguns camundongos não conseguiram se exercitar por 2min, implicando num maior tempo de descanso destes.

Após 20 semanas do início do experimento, os animais foram pesados e sacrificados após inalação de dióxido de carbono (CO₂). Posteriormente, o trato

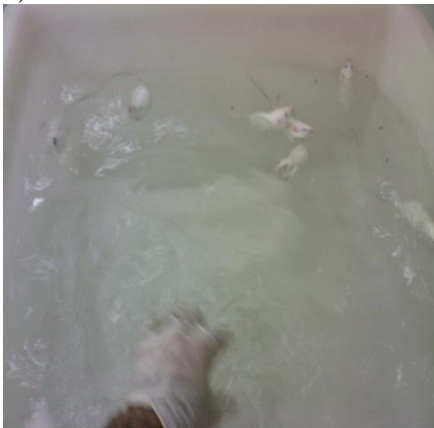
respiratório foi removido e fixado por instilação intratraqueal de solução 10% de formol. O número de nódulos e hiperplasia nos pulmões de cada camundongo foi contado utilizando microscopia óptica, por dois observadores simultaneamente (a orientadora, patologista e o aluno). Uma necrópsia completa foi realizada nos camundongos e foram avaliados macro e microscopicamente os pulmões, coração, fígado, baço, estômago, intestinos e rins.

Os pulmões de todos os camundongos foram analisados em sua totalidade histologicamente, corados com hematoxilina e eosina. As lesões foram classificadas em nódulos e hiperplasias, e os nódulos foram classificados em padrão papilífero, sólido ou misto, segundo Cury, 2000. ⁽⁸⁾ Foi optado por não classificar em adenoma ou carcinoma tendo em vista que não foram observadas metástases ou mitoses atípicas (figura 2 a, b e c).

Figura 1



c)



d)



e)



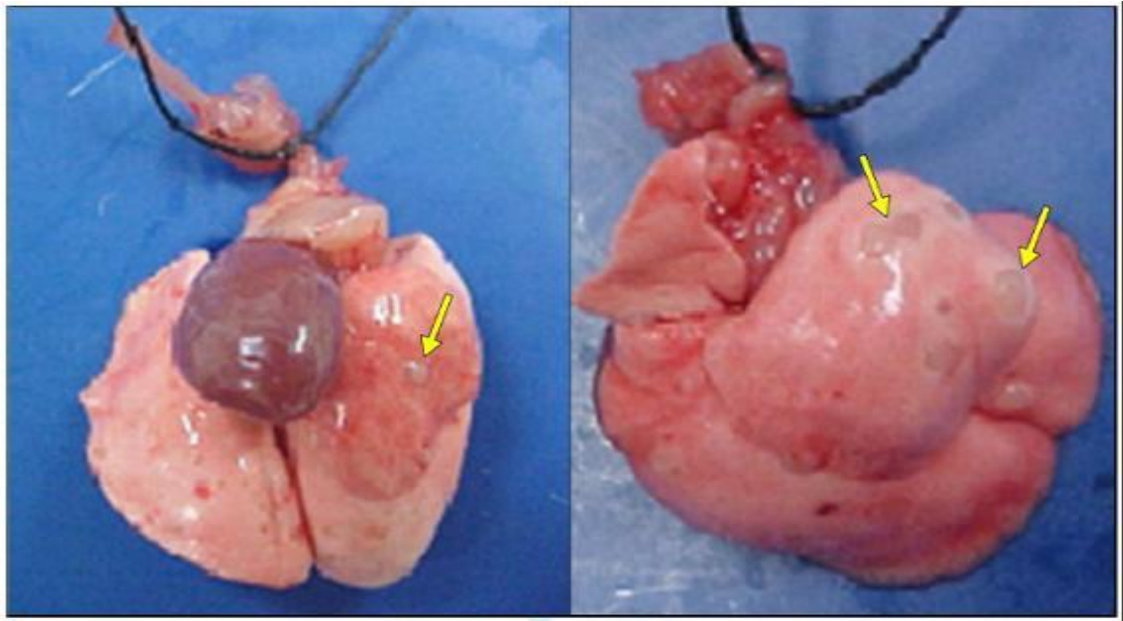
f)



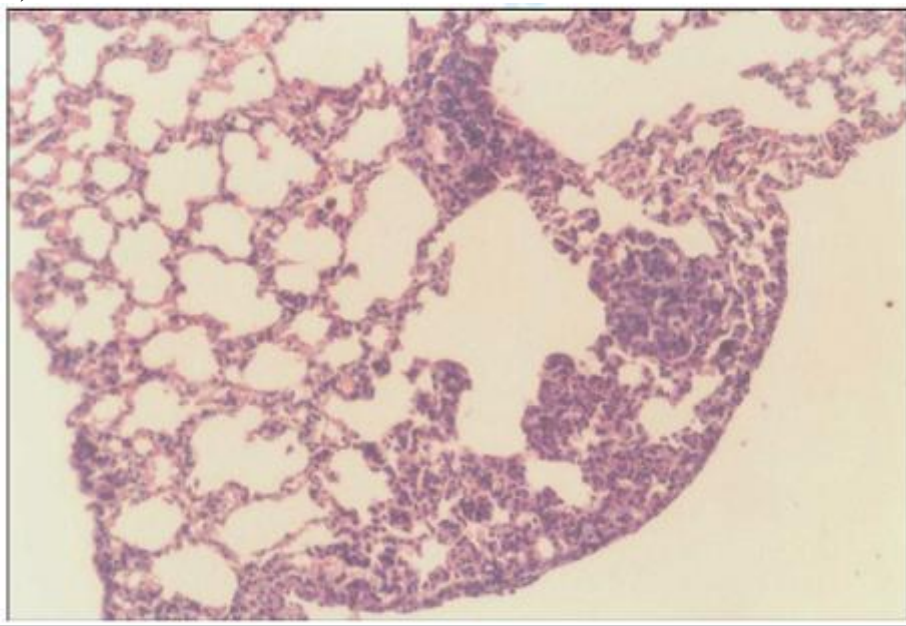
Legenda: a) camundongos do grupo aeróbio praticando a atividade física. b) camundongos do grupo aeróbio em momento de repouso na água. c) momento de indução da prática da atividade física aeróbia. d) imagem dos pesos que foram colocados nos camundongos do grupo anaeróbio. e) momento em que foi colocado o peso na cauda do camundongo. f) camundongos do grupo anaeróbio praticando a atividade física.

Figura 2:

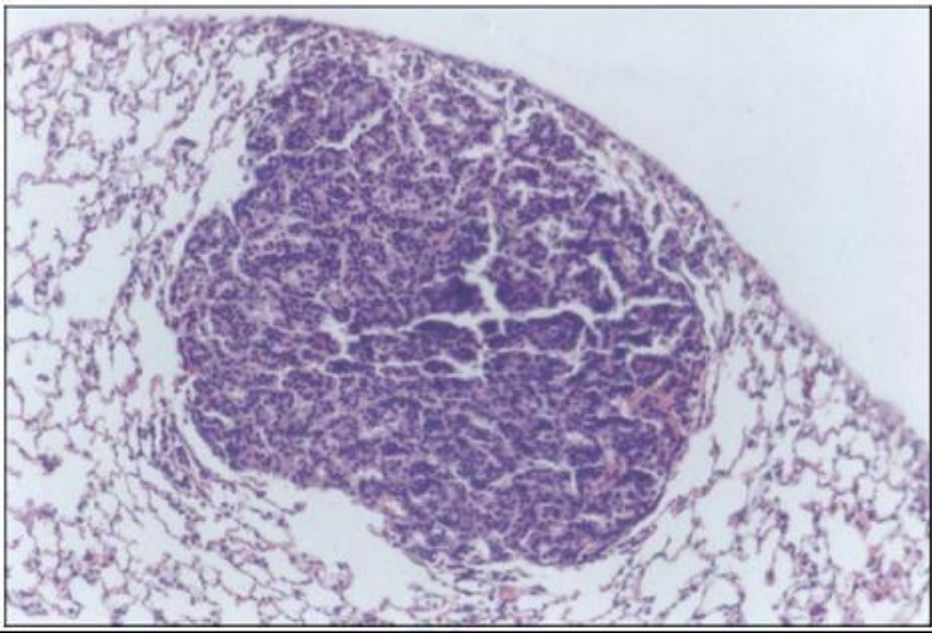
a)



b)



c)



Legenda: a) visão macroscópica dos pulmões e do coração. Presença dos nódulos pulmonares indicados pela seta amarela. b) visão microscópica do pulmão: hiperplasia (HE, 100X). c) visão microscópica do pulmão: nódulo (HE, 100X).

Resultados

Após o término do protocolo de treinamento e 20 semanas após a injeção da uretana, todos os animais foram sacrificados e uma autópsia foi realizada como mencionado. Não ocorreram alterações significativas ou metástases em outros órgãos, além dos pulmões.

Na figura 3, observa-se o aumento dos pesos dos animais, por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

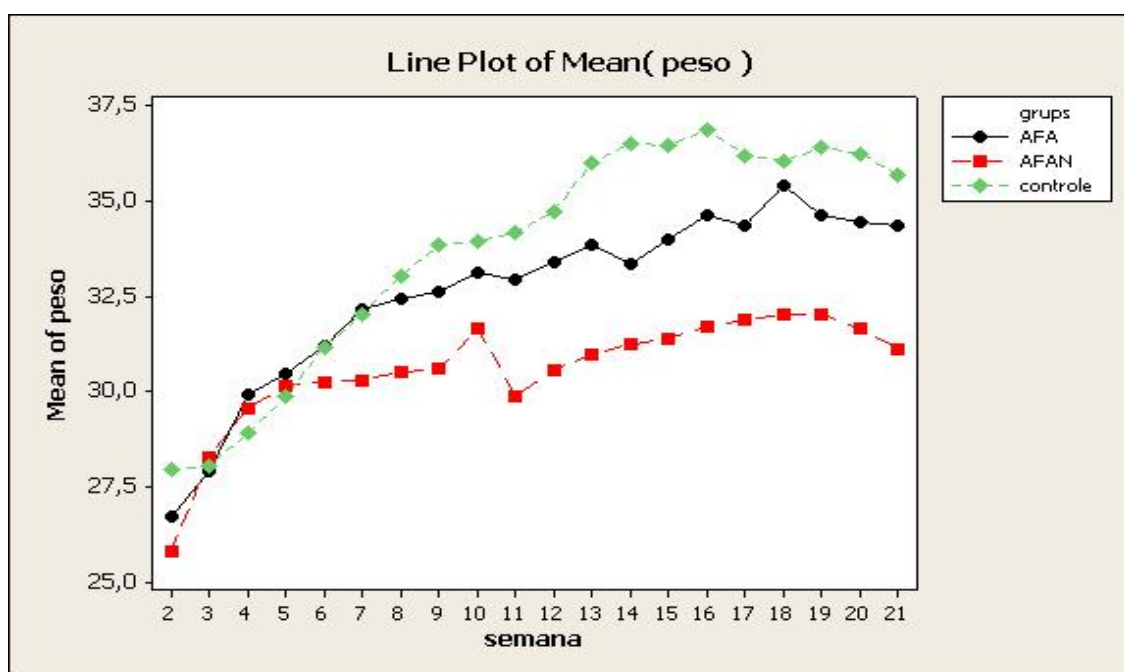


Figura 3: Comparação do peso médio de cada grupo durante o período experimental.

Siglas: AFA: grupo aeróbio; AFAN: grupo anaeróbio

Na figura 4, observa-se o aumento progressivo do peso utilizado nos animais submetidos ao exercício anaeróbico.

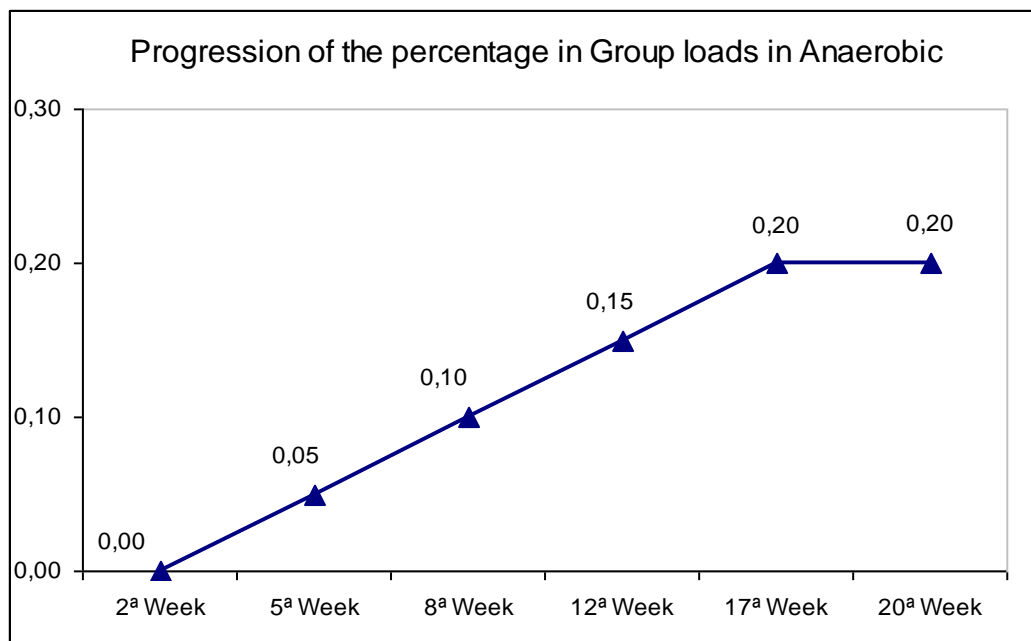


Figura 4: Progressão do peso nos camundongos do grupo anaeróbio.

Na tabela 1, dados descritivos e numéricos relacionados ao número de nódulos e hiperplasias por grupo e por animal podem ser observados. No grupo 1, o número total de nódulos foi 52 e de hiperplasias foi 19. Nos grupos 2 e 3, houve 8 e 3 nódulos, 51 e 30 hiperplasias identificados, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre essas variáveis separadamente e comparados entre os grupos descritos acima. A tabela 2 descreve o número de nódulos sólidos, papilíferos e mistos e de lesões pulmonares totais verificado em cada animal nos três grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos histológicos ($p = 0,052$).

Tabela 1: Número e mediana de nódulos e hiperplasias por grupo e por animal.

Grupo 1 – Controle			Grupo 2 – Aeróbio			Grupo 3 – Anaeróbio		
	nódulos	hiperplasia		nódulos	hiperplasia		nódulos	hiperplasia
grupo 1_1	2	0	grupo 2_1	0	6	grupo 3_1	1	1
grupo 1_2	3	0	grupo 2_2	0	3	grupo 3_2	1	7
grupo 1_3	2	2	grupo 2_3	0	1	grupo 3_3	0	3
grupo 1_4	0	3	grupo 2_4	0	1	grupo 3_4	0	5
grupo 1_5	6	0	grupo 2_5	0	4	grupo 3_5	0	1
grupo 1_6	1	2	grupo 2_6	1	3	grupo 3_6	0	3
grupo 1_7	0	0	grupo 2_7	0	1	grupo 3_7	0	0
grupo 1_8	1	0	grupo 2_8	1	4	grupo 3_8	0	3
grupo 1_9	3	0	grupo 2_9	1	3	grupo 3_9	0	0
grupo 1_10	2	0	grupo 2_10	1	1	grupo 3_10	0	0
grupo 1_11	2	0	grupo 2_11	0	3	grupo 3_11	0	0
grupo 1_12	3	1	grupo 2_12	0	2	grupo 3_12	0	2
grupo 1_13	5	0	grupo 2_13	0	2	grupo 3_13	0	0
grupo 1_14	6	0	grupo 2_14	0	3	grupo 3_14	1	1
grupo 1_15	2	1	grupo 2_15	1	0	grupo 3_15	0	1
grupo 1_16	5	0	grupo 2_16	1	2	grupo 3_16	0	2
grupo 1_17	1	5	grupo 2_17	0	3	grupo 3_17	0	1
grupo 1_18	1	2	grupo 2_18	1	1	grupo 3_18	0	0
grupo 1_19	1	0	grupo 2_19	0	1	Total	3	30
grupo 1_20	1	0	grupo 2_20	0	1	Mediana	0.00	1.00
grupo 1_21	2	0	grupo 2_21	0	0			
grupo 1_22	0	1	grupo 2_22	0	2			
grupo 1_23	2	0	grupo 2_23	0	3			
grupo 1_24	1	2	grupo 2_24	0	0			
Total	52	19	grupo 2_25	1	1			
Mediana	2.00	0.00	Total	8	51			
			Mediana	0.00	2.00			

Tabela 2a: Número e padrão histológico de lesões pulmonares por animal, no grupo controle.

Grupo / Animal	Nódulos totais	Nódulo Sólido	Nódulo Papilífero	Nódulo Misto	Hiperplasia	Lesões totais
Controle 1	2	1	0	1	0	2
Controle 2	3	0	3	0	0	3
Controle 3	2	0	2	0	2	4
Controle 4	0	0	0	0	3	3
Controle 5	6	5	1	0	0	6
Controle 6	1	1	0	0	2	3
Controle 7	0	0	0	0	0	0
Controle 8	1	1	0	0	0	1
Controle 9	3	1	0	2	0	3
Controle 10	2	2	0	0	0	2
Controle 11	2	0	2	0	0	2
Controle 12	3	2	1	0	1	4
Controle 13	5	1	2	2	0	5
Controle 14	6	3	3	0	0	6
Controle 15	2	1	1	0	1	3
Controle 16	5	5	0	0	0	5
Controle 17	1	1	0	0	5	6
Controle 18	1	0	1	0	2	3
Controle 19	1	0	1	0	0	1
Controle 20	1	1	0	0	0	1
Controle 21	2	0	1	1	0	2
Controle 22	0	0	0	0	1	1
Controle 23	2	1	0	1	0	2
Controle 24	1	1	0	0	2	3

Tabela 2b: Número e padrão histológico de lesões pulmonares, no grupo aeróbio.

Grupo / Animal	Nódulos totais	Nódulo Sólido	Nódulo Papilífero	Nódulo Misto	Hiperplasia	Lesões totais
AFA 1	6	4	2	0	0	6
AFA 2	3	2	0	1	0	3
AFA 3	1	1	0	0	0	1
AFA 4	1	0	0	1	0	1
AFA 5	4	1	2	1	0	4
AFA 6	3	2	1	0	1	4
AFA 7	1	1	0	0	0	1
AFA 8	4	4	0	0	1	5
AFA 9	3	0	1	2	1	4
AFA 10	1	0	0	1	1	2
AFA 11	3	3	0	0	0	3
AFA 12	2	1	1	0	0	2
AFA 13	2	2	0	0	0	2
AFA 14	3	2	1	0	0	3
AFA 15	0	0	0	0	1	1
AFA 16	2	2	0	0	1	3
AFA 17	3	3	0	0	0	3
AFA 18	1	1	0	0	1	2
AFA 19	1	0	1	0	0	1
AFA 20	1	0	0	1	0	1
AFA 21	0	0	0	0	0	0
AFA 22	2	2	0	0	0	2
AFA 23	3	1	2	0	0	3
AFA 24	0	0	0	0	0	0
AFA 25	1	1	0	0	1	2

Legenda: AFA: camundongos submetidos a exercícios aeróbicos

Tabela 2c: Número e padrão histológico de lesões pulmonares, no grupo anaeróbio.

Grupo / Animal	Nódulos totais	Nódulo Sólido	Nódulo Papilífero	Nódulo Misto	Hiperplasia	Lesões totais
AFAN 1	1	1	0	0	1	2
AFAN 2	7	5	2	0	1	8
AFAN 3	3	1	1	1	0	3
AFAN 4	5	2	2	1	0	5
AFAN 5	1	0	1	0	0	1
AFAN 6	3	2	1	0	0	3
AFAN 7	0	0	0	0	0	0
AFAN 8	3	1	2	0	0	3
AFAN 9	0	0	0	0	0	0
AFAN 10	0	0	0	0	0	0
AFAN 11	0	0	0	0	0	0
AFAN 12	2	0	2	0	0	2
AFAN 13	0	0	0	0	0	0
AFAN 14	1	0	1	0	1	2
AFAN 15	1	0	1	0	0	1
AFAN 16	2	1	1	0	0	2
AFAN 17	1	0	1	0	0	1
AFAN 18	0	0	0	0	0	0

Legenda: AFAN: camundongos submetidos a exercícios anaeróbicos.

Os resultados do número de nódulos, subtipos nodulares, hiperplasias e lesões totais em cada grupo encontram-se na figura 5. As tabelas 3 e 4 demonstram o número de animais de cada grupo que não apresentaram e apresentaram uma determinada quantidade de nódulos pulmonares e hiperplasias, respectivamente.

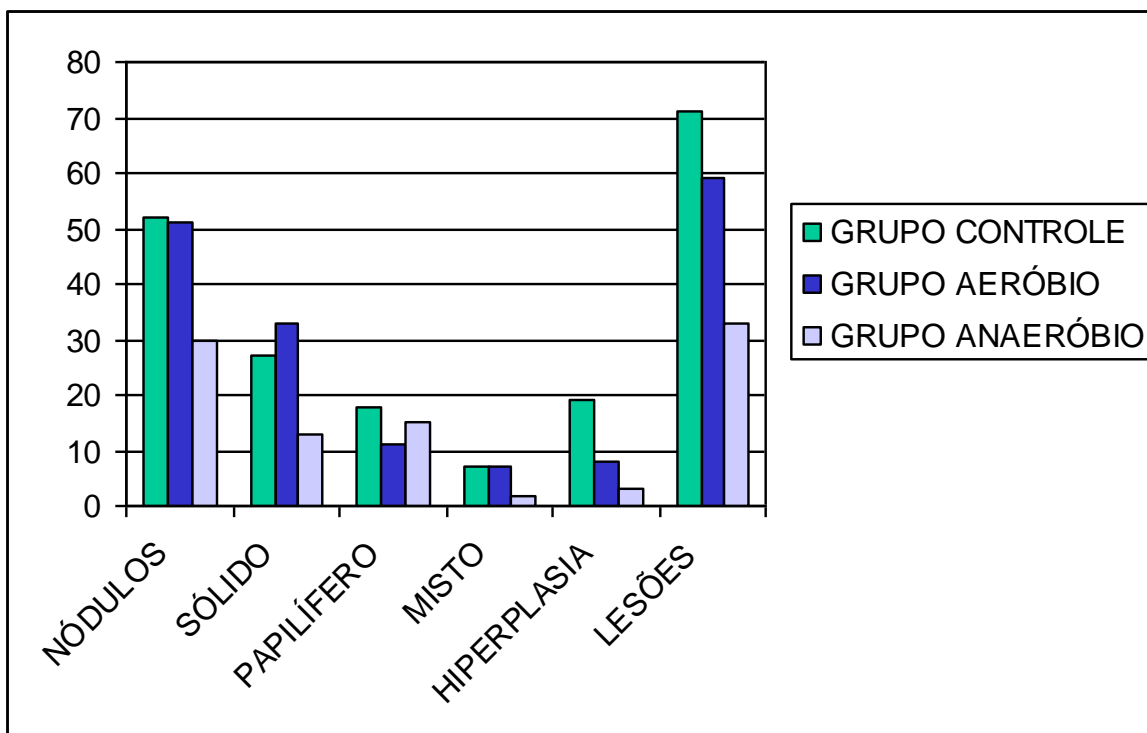


Figura 5: Quantidade de nódulos, subtipos nodulares, hiperplasias e lesões totais verificada em cada grupo. Não houve diferença estatística em relação ao tipo de lesão observado.

A mediana do número de nódulos no grupo controle foi de 2,0, enquanto nos grupos aeróbio e anaeróbio foi de 0,0. A mediana de hiperplasia foi de 0,0 para o grupo controle, 2,0 para o grupo aeróbio e 1,0 para o anaeróbio. A soma da mediana de nódulos e hiperplasias (número total de lesões) foi de 3,0 para o grupo controle, 2,0 para o grupo aeróbio e 1,5 para o anaeróbio. Pelo Teste de Kruskal-Wallis com comparações pareadas de Bonferroni, houve diferença significativa na mediana do número de lesões no grupo controle em relação ao grupo anaeróbio (figura 6, $p = 0,0151$).

Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,052$), quando comparado apenas a presença ou ausência de lesões pulmonares, houve uma diminuição no número de lesões no grupo 3 quando comparado ao grupo 1 ($p = 0,03$), mas não em relação ao grupo 2 ($p = 0,1415$).

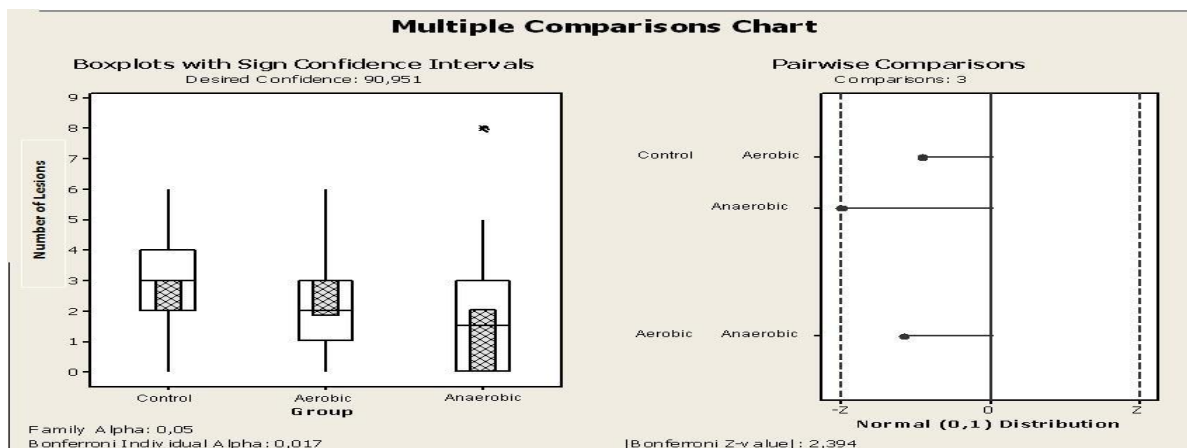


Figura 6: Comparação da mediana do número total de lesões nos 3 grupos. Houve diferença entre o grupo anaeróbico e os outros ($p = 0,0151$)

Tabela 3: Quantidade de animais de cada grupo que não apresentaram e apresentaram nódulos pulmonares (variação do número de 0 a 8). Teste do Qui-Quadrado = 3,984; DF = 2; P = 0,136; Likelihood Ratio Chi-Square = 3,639; DF=2; P = 0,162

Nº de Nódulos	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Grupo Controle	3	7	7	3	0	2	2	0	0
Grupo Aeróbio	3	8	4	7	2	1	1	0	0
Grupo Anaeróbio	6	5	2	3	0	1	0	1	0

Tabela 4: Quantidade de animais de cada grupo que não apresentaram e apresentaram hiperplasias pulmonares (variação do número de 0 a 5). Teste do Qui-Quadrado = 2,220; DF = 2; P = 0,330; Likelihood Ratio Chi-Square = 2,367; DF = 2; P = 0,306

Nº de hiperplasias	0	1	2	3	4	5
Grupo Controle	15	3	4	1	0	1
Grupo Aeróbio	17	8	0	0	0	0
Grupo Anaeróbio	15	3	0	0	0	0

Discussão

Em nosso estudo, observamos que a atividade física anaeróbia, mas não a aeróbia, diminuiu a incidência dos tumores de pulmão experimental. Existem vários estudos mostrando que a atividade física pode ser muito benéfica para pacientes com câncer, especialmente em relação à qualidade de vida, após a recuperação cirúrgica ^(9,22) e também em relação à prevenção de alguns tipos de câncer, como o de cólon. ⁽²⁰⁾

Em um estudo prospectivo com mulheres praticando altos níveis de atividade física no lazer, os resultados mostraram uma diminuição do risco de câncer, particularmente em tumores no cólon distal. Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que quando a intensidade da atividade física foi moderada à vigorosa, houve associação com uma redução significativa no risco geral de câncer, e até mesmo a caminhada de uma hora por semana foi suficiente para reduzir o risco de câncer de cólon em mulheres. ⁽²³⁾ Em outro estudo com mulheres na pós-menopausa, a redução do

risco de câncer de mama parece estar limitada à atividade física vigorosa, o que foi evidente entre as mulheres com peso normal, mas não em mulheres com sobrepeso. ⁽²⁴⁾

Outros estudos mostram que a atividade física a longo prazo diminui o câncer, enquanto alguns autores sugerem que, em alguns sobrevivente de câncer, o exercício melhora a qualidade de vida e diminui a depressão e ansiedade nas mulheres. ⁽²⁵⁻²⁶⁾

Existem diferentes protocolos que são usados para estudar a influência da atividade física, como a esteira, ⁽²⁷⁾ mas há poucos trabalhos experimentais com exercícios anaeróbios, como o nosso. O fato de que o nosso estudo não mostrou um papel da atividade aeróbia na progressão do câncer poderia ser devido ao pequeno número de animais ou à extensão do tempo de estudo. A avaliação e comparação da hipertrofia muscular e do lactato sérico entre os grupos aeróbio e anaeróbio não foram realizados, como já está bem estudado e confirmado neste modelo pelo nosso grupo e na literatura. ⁽²¹⁾

Um estudo interessante realizado por Simões e colaboradores demonstrou que o treinamento de natação na intensidade do limiar anaeróbio melhora a aptidão funcional de ratos idosos. Foi realizado uma adaptação ao meio líquido que consistiu na manutenção dos ratos em contato com a água em tanques coletivos à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 2 semanas, 5 dias por semana por 30 minutos, com o propósito de reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água. Foi realizada também uma avaliação da capacidade aeróbia pré e pós-treinamento, sendo que testes e retestes incrementais em natação foram feitos para avaliar a capacidade aeróbia. Os testes constituíram de uma sobrecarga inicial referente ao peso corporal com incrementos de 1% da massa corporal (chumbo atado ao tórax do animal a partir de um fixador *Velcro*®) a cada estágio de 3 minutos até a exaustão. Pausas de 1 minuto foram

realizadas entre os estágios para troca das cargas e coleta das amostras sanguíneas. O protocolo de treinamento aeróbio na natação foi realizado durante 4 semanas, na frequência de cinco dias semanais com duração de 30 minutos por dia. A intensidade do treinamento foi correspondente a 5% do peso corporal. Neste estudo conclui-se que quatro semanas de treinamento de natação em intensidade correspondente ao limiar de lactato resultou em uma melhora da aptidão aeróbia e na manutenção do peso corporal em ratos idosos. ⁽²⁸⁾

Optamos por chamar de ‘nódulos’ e não adenomas ou carcinomas, pela experiência anterior, ⁽⁸⁾ como não observamos a presença de metástases para caracterizar definitivamente uma lesão como um carcinoma. No entanto, a histologia do nódulo observado neste estudo apresentou pouca atipia citológica e baixo número, de que nos faz pensar que as lesões encontradas nesse estudo foram adenomas.

Nosso estudo experimental mostrou que, embora a atividade física aeróbia aparentemente também diminuiu a incidência dos tumores de pulmão, os resultados não foram estatisticamente significativos. Por outro lado, a atividade física anaeróbia, aparentemente, não apenas diminuiu a progressão, mas também a formação dos nódulos pulmonares, pois mais camundongos do grupo 3 não tiveram lesões, mesmo após a indução da uretana.

Em relação ao câncer de pulmão, existem alguns estudos que tratam com exercícios aeróbios, mas não com anaeróbio, e principalmente após o tratamento. ⁽¹⁷⁾ O aumento do VO_2 é um dos mecanismos sugeridos para influenciar o melhor desempenho nos pacientes submetidos à atividade física aeróbia e anaeróbia, sendo que isso está relacionado ao aumento da função metabólica, muscular e cardiorrespiratória.

⁽²⁹⁾

Uma das possíveis explicações é que o exercício anaeróbio induz hipóxia.⁽³⁰⁾ A falta de oxigênio está relacionada com a progressão de neoplasias, e estimula o fator induzido por hipóxia 1-alfa (FHIT-1), um gene supressor que, sob circunstâncias diferentes, pode promover a tumorigênese e apoptose.⁽³¹⁻³²⁾ Exercícios anaeróbios, no entanto, também estimulam o metabolismo e capacidade cardiorrespiratória. Esta poderia ser a razão pela qual as células direcionam-se para a via apoptótica e não para a progressão tumoral. Mais estudos relacionados com a via fisiopatológica em exercícios anaeróbios e câncer devem ser realizados.

Em relação à atividade física aeróbica, estudo recente de Veljkovic e colegas,⁽³³⁾ demonstrou uma diminuição da proteína VIP (Peptídeo Intestinal Vasoativo), devido à maior presença de anticorpos anti-VIP em pacientes com atividade física aeróbica, com câncer de mama e de próstata, em comparação com grupos controles saudáveis. Essa proteína é um fator de crescimento autócrino que regula a proliferação, diferenciação e crescimento de células de câncer de mama. Ele também induz a transativação do receptor fator de crescimento epidérmico (EGFR), envolvido na carcinogênese pulmonar e no receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2), além de aumentar a expressão dos oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*.⁽³³⁾

Não existem, na literatura inglesa, outras pesquisas semelhantes com atividade física anaeróbica. O fato de não termos obtido resultados positivos com a atividade aeróbica também poderia ser um problema de amostragem e um estudo com um maior número de animais poderia ser feito para confirmar essa possibilidade.

A atividade física é hoje amplamente recomendada para a assistência médica em geral. No entanto, os médicos geralmente pensam em exercícios aeróbios. O treinamento de resistência e outras atividades anaeróbias devem ser estimulados a fim

de prevenir e ajudar não só as doenças cardiovasculares, mas também em pacientes com câncer. ⁽²⁸⁻²⁹⁾

Em conclusão, embora os mecanismos não sejam bem explicados, a atividade física anaeróbia parece ter um efeito inibitório na incidência e progressão de tumores de pulmão experimental e não deve ser negligenciada.

Conclusões:

- 1 - A atividade física influi na progressão do câncer de pulmão experimental.

- 2 - A atividade física anaeróbia diminuiu a incidência dos tumores pulmonares, enquanto que a atividade física aeróbia não diminuiu com diferença estatisticamente significativa.

- 3 - Não houve diferença no tipo de lesão pulmonar entre os dois grupos de atividade física e também em relação ao grupo controle.

Referências Bibliográficas:

1. Instituto Nacional do Câncer, 2013: <http://www.inca.gov.br>
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/
3. Siegel R, Naishadham D and Jemal A. [Cancer statistics, 2012](#). CA Cancer J Clin. 2012; 62(1):10-29.
4. Courneya KS and Karvinen KH. Exercise, aging and cancer. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2007; 32(6):1001-1007.
5. Furukawa F, Nishikawa A, Kasahara K, Lee IS, Wakabayashi K, Takahashi M and Hirose M. Inhibition by b-carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. Jpn. J. Cancer Res. 1999; 90(2):154-161.
6. Organização Pan-Americana da Saúde, 2002 – OPAS - www.opas.org.br
7. Reymão MSF, Cury PM, Lichtensfels AJFC, Lemos M, Battlehner CN, Conceição GMS, Capelozzi VL, Montes GS, Júnior MF, Martins MA, Böhm GM and Saldiva PHN. Urban Air Pollution enhances the formation of formatin

- urethane-induced lung tumors in mice. *Environmental Research* 1997; 74(2):150-158.
8. Cury PM, Lichtenfels AJFC, Reymão MSF, Conceição GMS, Capelozzi VL, Saldiva PHN. Urban air pollution levels modifies the progression of urethane induced lung tumors in mice. *Pathol. Res Pract.* 2000; 196(9):627-633.
 9. Turusov V and Mohr U. *Pathology of Tumors in Laboratory Animals*. International Agency for Research on Cancer (WHO), 1994. 2ed. Lyon: IARC Scientific Publications.
 10. Malkinson, AM. Genetic studies on lung tumor susceptibility and histogenesis in mice. *Environmental Health Perspectives* 1991; 93:149-159.
 11. Alves, LE. Estudo comparativo entre os efeitos do exercício aeróbico e do anaeróbico no crescimento tumoral e caquexia em ratos com tumor de Walker 256. Identificação de mediadores participantes neste processo, 2008. [Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná].
 12. Prada FJA, Voltarelli, FA, Oliveira CAM, Gobatto CA, Macedo DV, Mello MA R. Condicionamento aeróbico e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. *R. Bras. Ci e Mov.* 2004; 12(2): 29-34.

13. Nagamine, KK. Mulheres em programa regular de atividade física: ansiedade, depressão, fadiga, *burnout* e qualidade vida, 2009. [Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas].

14. Leitão MB, Lazzoli JK, Oliveira MAB, Nóbrega ACL, Silveira GG, Carvalho, T et al. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: Atividade Física e Saúde na Mulher - Rev Bras Med Esporte 2000; 6(6)215-220.

15. Lazzoli JK, Nóbrega ACL, Carvalho T, Oliveira MAB, Teixeira JAC, Leitão MB, et al. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: Atividade física e saúde na infância e adolescência. Rev Bras Med Esporte 1998; 4(4):107-109.

16. Friedenreich CM and Orenstein MR. Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms. Journal of Nutrition 2002; 132:3456S–3464S.

17. Lee IM, Sesso HD and Paffenbarger RS Jr. Physical activity and risk of lung cancer. International Journal of Epidemiology 1999; 28:620-625.

18. Greene NP, Greene ES, Carbuhn AF, Green JS, Crouse SF. VO_2 prediction and cardiorespiratory responses during underwater treadmill exercise. *Res Q Exerc Sport* 2011; 82(2):264-73.
19. Courneya KS. Exercise in Cancer Survivors: An Overview of Research. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(11):1846-52.
20. Valenti M, Porzio G, Aiello F, Verna L, Cannito K, Manno R, Masedu F, Marchetti P., Ficorella C. Physical Exercise and Quality of Life in Breast Cancer Survivors – *Int J Med Sci.* 2008; 5(1)24-28.
21. Neiva CM and Mello MAR. Analysis of the effects of protein-energy malnutrition on the responses of acute exercise (single session) - metabolic parameters. *Motive*, 1995; n° 1, p. 3243.
22. Coups EJ, Park BJ, Feinstein MB, Steingart RM, Egleston BL, Wilson DJ, Ostroff JS. Correlates of physical activity among lung cancer survivors - *Psychooncology* 2009; 18(4):395-404.
23. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2009; 100(4):611-616.

24. Leitzmann MF, Moore SC, Peters TM , Lacey Jr JV, Schairer C, Brinton LA, et al. Prospective study of physical activity and risk of postmenopausal breast cancer - Breast Cancer Res. 2008; 10:R92.
25. Galvao DA, Newton RU. Review of exercise intervention studies in cancer patients. J Clin Oncol. 2005; 23(4):899-909.
26. Vieira JLP, Porcu M and Rocha PGM. Exercícios físicos regulares como terapia complementar em mulheres com depressão - J Bras Psiquiatr. 2007; 56(1)23-28.
27. Santhiago V, Silva ASR, Gobatto CA, Mello MAR. Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos - Rev Bras Med Esporte 2006; Vol.12, nº 2.
28. Simões HG, Cunha VNC, Cunha RR, Segundo PR, Moreira SR. Treinamento de natação na intensidade do limiar anaeróbio melhora a aptidão funcional de ratos idosos - Rev Bras Med Esporte 2008; Vol.14, nº 6.
29. Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular - Rev Paul Educ Fís. São Paulo, 2004; 18:21-31.

30. Gatenby RA, Smallbone K, Main PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, et al. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *British Journal of Cancer* 2007; 97:646-653.
31. Jin SK, Hojoong K, Young MS, Joungho H, Joobae P, Duk-Hwan K. Aberrant methylation of the FHIT gene in chronic smokers with early stage squamous cell carcinoma of the lung . *Carcinogenesis* 2004; 25(11):2165-2171.
32. Swinsond EB, Jones JL, Cox G, Richardson D, Harris AL, O'Byrne KJ. Hypoxia-inducible factor-1 in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways *Int. J. Cancer* 2004; 111:43-50.
33. Veljkovic M, Dopsaj V, Dopsaj M, Branch DR, Veljkovic N, Sakarellos-Daitsiotis MM, et al. Physical Activity and Natural Anti-VIP Antibodies: Potential Role in Breast and Prostate Cancer Therapy. *PLoS One.* 2011; 6(11):e28304.
34. Leitzmann MF, Moore SC, Peters TM , Lacey JV Jr, Brinton LA, Schairer C et al. Prospective study of physical activity and risk of postmenopausal breast cancer - *Breast Cancer Res.* 2008; 10(5):R92.

Anexo 1

(artigo enviado e publicado na Revista Pathology Research and Practice)



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pathology – Research and Practice

journal homepage: www.elsevier.de/prp



Original article

The influence of physical activity in the progression of experimental lung cancer in mice

Renato Batista Paceli^{a,c}, Rodrigo Nunes Cal^a, Carlos Henrique Ferreira dos Santos^c,
José Antonio Cordeiro^c, Cassiano Merussi Neiva^d, Kazuo Kawano Nagamine^{b,c}, Patrícia Maluf Cury^{a,*}

^a School of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, Department of Pathology and Forensic Medicine, Brazil

^b School of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, Department of Epidemiology and Public Health, Brazil

^c School of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, Physical Activity and Health Laboratory, LAFIS, Brazil

^d School of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, Paulista State University, School of Science of Bauru, Unesp, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2011

Received in revised form 1 November 2011

Accepted 1 April 2012

Keywords:

Physical activity
Experimental lung cancer
Aerobic exercise
Anaerobic exercise

SUMMARY

Lung cancer is one of the most incident neoplasms in the world, representing the main cause of mortality for cancer. Many epidemiologic studies have suggested that physical activity may reduce the risk of lung cancer, other works evaluate the effectiveness of the use of the physical activity in the suppression, remission and reduction of the recurrence of tumors.

The aim of this study was to evaluate the effects of aerobic and anaerobic physical activity in the development and the progression of lung cancer.

Lung tumors were induced with a dose of 3 mg of urethane/kg, in 67 male Balb – C type mice, divided in three groups: group 1.24 mice treated with urethane and without physical activity; group 2.25 mice with urethane and subjected to aerobic swimming free exercise; group 3.18 mice with urethane, subjected to anaerobic swimming exercise with gradual loading 5–20% of body weight. All the animals were sacrificed after 20 weeks, and lung lesions were analyzed.

The median number of lesions (nodules and hyperplasia) was 3.0 for group 1, 2.0 for group 2 and 1.5–3 ($p=0.052$). When comparing only the presence or absence of lesion, there was a decrease in the number of lesions in group 3 as compared with group 1 ($p=0.03$) but not in relation to group 2. There were no metastases or other changes in other organs.

The anaerobic physical activity, but not aerobic, diminishes the incidence of experimental lung tumors.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Lung cancer remains the most common neoplasm in the world (15% of all new cases of cancer) and is also the most frequent cause of cancer death. Median survival in five years is 13% in developed countries (ranging from 13% to 21%) and 9% (ranging between 7% and 10%) in developing countries. The world average is estimated at 11% [10].

The relationship between lung cancer and physical activity is not clear. Although many epidemiologic studies have suggested that physical activity may reduce the risk of lung cancer, this is not a conclusive point [22].

There are several physiological mechanisms by which regular physical activity can reduce the mortality rate, both in primary and secondary prevention of many diseases, acting effectively as an

auxiliary treatment [3,12,17]. Studies show that long term physical activity decreases the risk of cancer, while others suggest that in some cancer, survivor's exercise improves quality of life [8]. Exercise can also relieve depression and anxiety in women [27].

It is also known that physical activity may improve prognosis by a beneficial effect on the biomarkers and energy balance, and reduce the risk for cardiovascular disease, which is a major cause of death in people who survived cancer [12,24].

There are many experimental models to study physical activity. Swimming seems to be better than treadmill as it is less stressful, as demonstrated by many authors [3,5,12,17,22]. In the swimming model, the terms aerobic and anaerobic were validated based on biomarkers as lactate [1,15,28].

Urethane, an ester of carbamic acid, is a widely used carcinogen in experimental chemical carcinogenesis [7,18]. It can be administered orally or by injection, and allows the production of tumor in a short period of time. Within two months, one can observe alveolar hyperplasia and after four months of urethane induction, a fully developed tumor nodule, histologically classified as lung adenoma. As this model promotes usually more than one lesion for each

* Corresponding author at: Alameda Jaú, 161 apto 101, CEP: 01420-000, São Paulo, SP Brazil.

E-mail address: pmcury@hotmail.com (P.M. Cury).

animal, it is possible to count and compare tumors in different groups. Urethane has also low toxicity and therefore a low mortality rate.

In previous studies, we investigated the effect of air pollution in relation to lung cancer in an experimental model in mice [18,21]. Tumors in the lungs of mice are an important model in cancer research, and counting the number of lung nodules is an easy way to evaluate the effects of a promoter or inhibitor agent [7,19].

The aim of this study is to evaluate the effects of aerobic and anaerobic physical activity in the development and progression of lung cancer in mice.

Materials and methods

After the approval from the Ethics Committee, 67 male Balb-C adults mice were employed in the experiment. The animals were kept in cages at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity of 60% and subjected to 12 h light and 12 h of darkness per day, with water and food *ad libitum*.

On the first day of experiment, 3 mg/kg urethane was injected intraperitoneally into each mouse, in two separate doses of 1.5 mg/kg with 48 h interval between them.

The animals were divided into three groups. Group 1: control, no physical activity, $n=24$. Group 2: aerobic, $n=25$. And group 3: anaerobic, $n=18$.

As in this model, lung cancer is not developed spontaneously; there was no need to make a control group without urethane and without physical activity.

Training protocol

Mice were submitted to an aerobic training program adapted from other studies [4,15]. They were placed in a plastic container with water at a depth of 40 cm maintained at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

After the urethane injection, exercise protocols were applied to the animals. The training program began within a week of adaptation to the water, which consisted in putting the mice

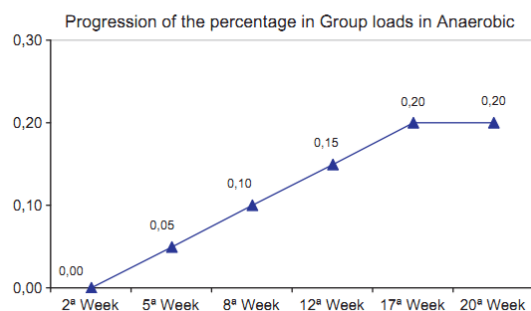


Figure 1. Load progression in the mice. Each load was maintained for three weeks.

for progressive periods of 10 min/day, reaching 50 min at the end of 5 days. From the second week until the 20th week, the animals were submitted to an aerobic training protocol (group 2), which consists of four weekly swimming sessions of 20 min each.

The anaerobic training (group 3) consisted of three weekly sessions of 20 min of forced swimming with progressive loading 5–20% of body weight (Fig. 1). The training time was divided in 2 min swimming with load and 2 min of resting interval, respectively. The load model was adapted with weights (leads) placed on the mice's tail.

Body weight was measured weekly, and the load was estimated and increased accordingly. A load more than 3% of the body weight is defined as an anaerobic exercise, while the frequency of three weekly sections is considered a moderate training protocol, a four weekly one is considered a heavy training [15].

After 20 weeks of the start of the experiment, the animals were weighed and sacrificed after inhalation of carbon dioxide (CO_2). Subsequently, the respiratory tract was removed and fixed by intratracheal instillation of 10% formalin solution. A complete autopsy was performed in mice. The number of nodules and

Table 1

Number and median of nodules and hyperplasia per group and per animal.

Nodules		Hyperplasia		Nodules		Hyperplasia		Nodules		Hyperplasia	
<i>Group 1 – control</i>				<i>Group 2 – aerobic</i>				<i>Group 3 – anaerobic</i>			
Group 1.1	2	0		Group 2.1	0	6		Group 3.1	1	1	
Group 1.2	3	0		Group 2.2	0	3		Group 3.2	1	7	
Group 1.3	2	2		Group 2.3	0	1		Group 3.3	0	3	
Group 1.4	0	3		Group 2.4	0	1		Group 3.4	0	5	
Group 1.5	6	0		Group 2.5	0	4		Group 3.5	0	1	
Group 1.6	1	2		Group 2.6	1	3		Group 3.6	0	3	
Group 1.7	0	0		Group 2.7	0	1		Group 3.7	0	0	
Group 1.8	1	0		Group 2.8	1	4		Group 3.8	0	3	
Group 1.9	3	0		Group 2.9	1	3		Group 3.9	0	0	
Group 1.10	2	0		Group 2.10	1	1		Group 3.10	0	0	
Group 1.11	2	0		Group 2.11	0	3		Group 3.11	0	0	
Group 1.12	3	1		Group 2.12	0	2		Group 3.12	0	2	
Group 1.13	5	0		Group 2.13	0	2		Group 3.13	0	0	
Group 1.14	6	0		Group 2.14	0	3		Group 3.14	1	1	
Group 1.15	2	1		Group 2.15	1	0		Group 3.15	0	1	
Group 1.16	5	0		Group 2.16	1	2		Group 3.16	0	2	
Group 1.17	1	5		Group 2.17	0	3		Group 3.17	0	1	
Group 1.18	1	2		Group 2.18	1	1		Group 3.18	0	0	
Group 1.19	1	0		Group 2.19	0	1		Total	3	30	
Group 1.20	1	0		Group 2.20	0	1		Median	0.00	1.00	
Group 1.21	2	0		Group 2.21	0	0					
Group 1.22	0	1		Group 2.22	0	2					
Group 1.23	2	0		Group 2.23	0	3					
Group 1.24	1	2		Group 2.24	0	0					
Total	52	19		Group 2.25	1	1					
Median	2.00	0.00		Total	8	51					
				Median	0.00	2.00					

Please cite this article in press as: R.B. Paceli, et al., The influence of physical activity in the progression of experimental lung cancer in mice, Pathol. – Res. Pract (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2012.04.006>

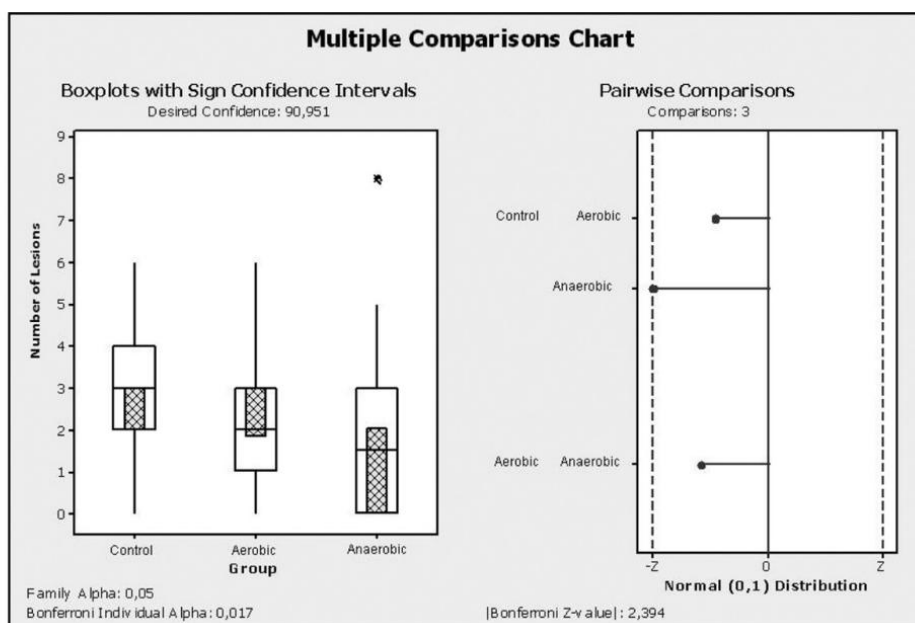


Figure 2. According to Bonferroni test and Bloxplots with sign confidence intervals, there is a decrease in the number of lesions (nodules and hyperplasias) in anaerobic group when compared with control group but not in relation to aerobic group ($p=0.03$).

hyperplasia in the lungs of each mouse was counted using optical microscopy.

Results

In Table 1, descriptive and numerical data, one can observe the number of nodules and hyperplasia per group and per animal. In group 1, the total number of nodules was 52, and 19 hyperplasias were found. In groups 2 and 3, there were 8 and 3 nodules, and 51 and 30 hyperplasias identified, respectively.

The median number of nodules in the control group was 2.00, while in the aerobic and anaerobic group, it was 0.0. The median of hyperplasia was 3.0 for the control group, 2.0 for the aerobic group, and 1.0 for the anaerobic. However, the median sum of nodules and hyperplasia (total number of lesions) was 3.0 for the control group, 2.0 for the aerobic group, and 1.5 for the anaerobic.

Although there was not a statistically significant difference between groups ($p=0.052$), when comparing only the presence or absence of lung lesions, there was a decrease in the number of lesions in group 3 when compared with group 1 ($p=0.03$) but not in relation to group 2 (Fig. 2). The animal weight was similar between groups. Macro and microscopical images of lesions are shown in Fig. 3. No metastasis or significant changes in other organs were observed in none of the groups.

Discussion

In our study, we observed that anaerobic but not aerobic physical activity diminished the incidence of experimental lung tumors. There are several studies showing that physical activity can be very beneficial for patients with cancer, especially in relation to quality of life, after surgical recovery [6,25] and also in relation to the prevention of some types of cancer, such as colon cancer [26].

In a prospective study with women performing high levels of leisure physical activity, the results showed a decreased

risk of cancer, particularly in tumors in the distal colon. On the other hand, the same study demonstrated that when intensity of physical activity was moderate to vigorous, it was associated with a significant reduction in overall risk of cancer. Even walking for 1 h a week was enough to reduce the risk of colon cancer in women [29]. In another study with postmenopausal women, breast cancer risk reduction appears to be limited to vigorous physical activity, which was more evident among women with normal weight, but not in overweight women [14].

Other protocols are used in order to study the influence of physical activity, such as treadmill [21], but there are few experimental works with anaerobic exercises, as we did. The fact that our study did not show the effects of aerobic activity in cancer progression could be due to the small number of animals or to the time extension of the protocol. The reason that evaluation and comparison of muscle hypertrophy and serum lactate between aerobic and anaerobic groups had not been performed is that it was already studied and confirmed in this model by our group and in other researches [15].

We chose to call "nodules" and not adenomas or carcinomas, by previous experience [7], as we did not observe the presence of metastases to definitively characterize a lesion as a carcinoma. However, the histology of nodules observed in this study displayed little cytological atypia, and the low number of mitoses made us consider that the lesions found in this study were adenomas.

Our experimental study has shown that although aerobic physical activity apparently diminished the incidence of lung tumors, the results were not statistically significant. On the other hand, physical anaerobic activity not only decreased the progression but also the formation of lung nodules, as a greater number of mice from group 3 had no lesions even after urethane induction.

In relation to lung cancer, there are some studies dealing with aerobic exercises, but not with an anaerobic one and mainly after

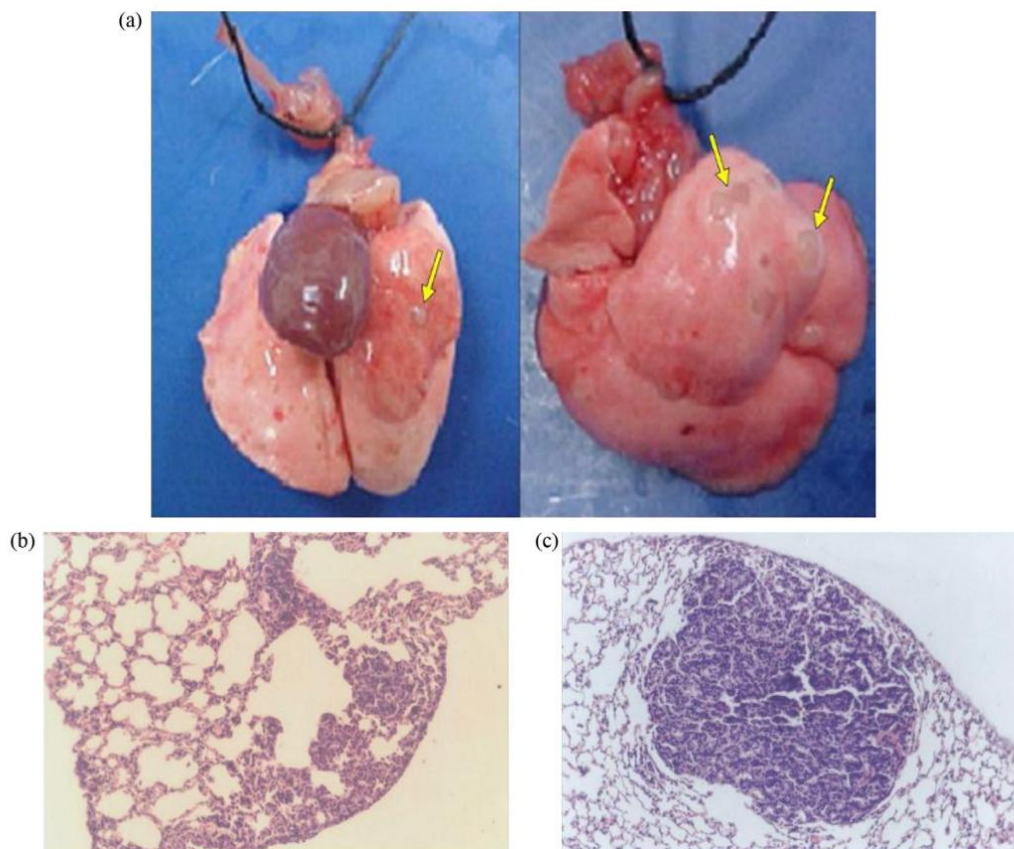


Figure 3. (a) Macroscopic view of the lungs and heart. Presence of nodules in the lung (arrows); (b) microscopic view of the lung: hyperplasia (HE, 100 \times); (c) microscopic view of the lung: nodule (HE, 100 \times).

treatment [13]. The VO_2 increasing is one of the mechanisms suggested to influence the better performance in the patients submitted to physical aerobic and anaerobic activity, as this is related to increasing metabolic, muscular and cardiorespiratory function [2].

One of the hypotheses to explain our results is that anaerobic exercise induces hypoxia [9]. The lack of oxygen is related to the progression of neoplasms and stimulates hypoxia-inducible factor-1 alpha (FHIT-1) a suppression gene that under different circumstances may promote both tumorigenesis and apoptosis [23]. Anaerobic exercises, however, also stimulate the metabolism and cardiorespiratory capacity. This could be the reason to direct the cells to the apoptotic pathway and not to tumoral progression. Further studies dealing with the physiopathologic pathway in anaerobic exercises and cancer should be performed.

Physical activity is nowadays widely recommended for general health care. Nevertheless, doctors usually think in aerobic exercise. Resistance training and other anaerobic activities should be stimulated in order to prevent and help not only cardiovascular diseases but also in cancer patients [2,26].

In conclusion, although the mechanisms are not well understood, anaerobic physical activity seems to have an inhibitory effect in the incidence and progression of experimental lung tumors and should not be neglected.

Acknowledgements

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and Fabiana Pupo Alves for the English support.

References

- [1] G.G. Araujo, F.B. Manchado-Gobatto, M. Papoti, M.A.R. Mello, C.A. Gobatto, Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos Wistar, *Rev. Bras. Med. Esporte* 16 (2010) 51–56.
- [2] P.C. Brum, C.L.M. Forjaz, T. Tinucci, C.E. Negrão, Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular, *Rev. Paul. Educ. Fis.* 18 (2004) 21–31.
- [3] D.E. Caro, F. Fioredda, M.G. Calevo, A. Smeraldi, M. Saitta, G. Hanau, M. Faraci, F. Grisolia, G. Dini, G. Pongiglione, R. Haupt, Exercise capacity in apparently healthy survivors of cancer, *Arch. Dis. Child* 91 (2006) 47–51.
- [4] p. Chimin, G.G. Araújo, F.B. Manchado-Gobatto, C.A. Gobatto, Critical load during continuous and discontinuous training in swimming Wistar rats, *Motricidade* 5 (2009) 45–58.
- [5] R.V.L. Contartezze, F.B. Manchado-Gobatto, C.A. Gobatto, M.A.R. Mello, Different stress biomarkers sensitivity during acute treadmill running exercise in rats, *J. Exer. Physiol. Online* 11 (2008) 18–27.
- [6] E.J. Coups, B.J. Park, M.B. Feinstein, R.M. Steingart, B.L. Egleston, D.J. Wilson, J.S. Ostroff, Correlates of physical activity among lung cancer survivors, *Psycho-Oncology* 18 (2009) 395–404.
- [7] P.M. Cury, A.J.F.C. Lichtenfelds, M.S.F. Reymão, G.M.S. Concepcion, V.L. Capelozzi, P.H.N. Saldiva, Urban air pollution levels modifies the progression

Please cite this article in press as: R.B. Paceli, et al., The influence of physical activity in the progression of experimental lung cancer in mice, *Pathol. – Res. Pract* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2012.04.006>

- of urethane-induced lung tumors in mice, *Pathol. Res. Pract.* 196 (2000) (2000) 627–633.
- [8] D.A. Galvao, R.U. Newton, Review of exercise intervention studies in cancer patients, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 899–909.
- [9] R.A. Gatenby, K. Smallbone, P.K. Main, F. Rose, J. Averill, R.B. Nagle, L. Worrall, R.J. Gillies, Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer, *Br. J. Cancer* 97 (2007) 646–653.
- [10] M.J. Horner, L.A.G. Ries, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou, N. Howlader, S.F. Altekruse, E.J. Feuer, L. Huang, A. Mariotto, B.A. Miller, D.R. Lewis, M.P. Eisner, D.G. Stinchcomb, B.K. Edwards, *SEER Cancer Stat. Rev.* (2009) 1975–2006.
- [12] J.K. Lazzoli, A.C.L. Nóbrega, T. Carvalho, M.A.B. Oliveira, J.A.C. Teixeira, M.B. Leitão, et al., Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: Atividade física e saúde na infância e adolescência, *Rev. Bras. Med. Esporte* 4 (1998) (1998) 107–109.
- [13] M. Lee, M.D. Sesso, R.S. Paffenbarger Jr., Physical activity and risk of lung cancer, *Int. J. Epidemiol.* 29 (1999) 620–625.
- [14] M.F. Leitzmann, S.C. Moore, T.M. Peters, J.V. Lacey Jr., A.S.S. Catherine, L.A. Brinton, Demetrius & Albanian (2008) Prospective study of physical activity and risk of postmenopausal breast cancer, *Breast Cancer Res.* 10 (2008) R92.
- [15] C.M. Neiva, M.A.R. Mello, Analysis of the effects of protein–energy malnutrition on the responses of acute exercise (single session)-metabolic parameters, *Motiv. 1* (1995) 3243.
- [17] D. Qiao, L. Hou, X. Liu, Influence of intermittent anaerobic exercise on mouse physical endurance and antioxidant components, *Br. J. Sports Med.* 40 (2006) 214–218.
- [18] M.S.F. Reymão, P.M. Cury, A.J.F.C. Lichtensfels, C.N. Lemos, C.N. Battlehner, G.M.S. Conception, V.L. Capelozzi, F. Montes Jr., M.A. Martins, G.M. Bohn, P.H.N. Saldiva, Urban air pollution enhances the formation of formalin urethane-induced lung tumors in mice, *Environ. Res.* 74 (1997) 150–158.
- [19] N.R. Salinas, C.T. Oshima, P.M. Cury, J.A. Cordeiro, V. Bueno, FTY720 and lung tumor development, *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 689–693.
- [21] V. Santhiago, A.S.R. Silva Da, C.A. Gobatto, M.A.R. Mello De, Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos, *Rev. Bras. Med. Esporte* 12 (2006) (2006) N° 2.
- [22] B.L. Sprague, A. Trentham-Dietz, B.E.K. Klein, R. Klein, K.J. Cruickshanks, K.E. Lee, J.M. Hampton, Physical activity, white blood cell count, and lung cancer risk in a prospective cohort study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) (2008) 2714–2722.
- [23] E.B. Swinson, J.L. Jones, G. Cox, D. Richardson, A.L. Harris, K.J. O'Byrne, Hypoxia-inducible factor-1 in non-small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways, *Int. J. Cancer* 111 (2004) 43–50.
- [24] A. Tardon, W.J. Lee, M. Delgado-Rodriguez, M. Dosemeci, D. Albanes, R. Hoover, A. Blair, Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis, *Cancer Causes Control* 16 (2005) 389–397.
- [25] V. Turusov, U. Mohr, Pathology of Tumors in Laboratory Animals. International Agency for Research on Cancer (WHO), 2nd ed., IARC Scientific Publications, Lyon, 1994.
- [26] M. Valenti, G. Porzio, F. Aiello, L. Verna, K. Cannito, R. Manno, F. Masedu, P. Marchetti, C. Ficarella, Physical exercise and quality of life in breast cancer survivors, *Int. J. Med. Sci.* 5 (2008) 24–28.
- [27] J.L. Vieira, M. Porcu, P.G.M. Rocha, Exercícios físicos regulares como terapia complementar em mulheres com depressão, *J. Bras. Psiquiatr.* 56 (2007) 23–28.
- [28] F.A. Voltarelli, C.A. Gobatto, M.A.R. Mello, Minimum blood lactate and muscle protein of rats during swimming exercise, *Biol. Sport.* 25 (2008) 23–34.
- [29] K.Y. Wolin, I.M. Lee, G.A. Colditz, R.J. Glynn, C. Fuchs, E. Giovannucci, Leisure-time physical activity patterns and risk of colon cancer in women, *Int. J. Cancer* 121 (2007) 2776–2781.