



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Beatriz Dias Vilela

**O EFEITO DE SOROS CONDICIONADOS PELO
EXERCÍCIO FÍSICO NUMA CULTURA DE CÉLULAS DE
CANCRO DA MAMA**

Setembro de 2023



FACULDADE DE
CIÊNCIAS DO DESPORTO
E EDUCAÇÃO FÍSICA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

O EFEITO DE SOROS CONDICIONADOS PELO EXERCÍCIO FÍSICO NUMA CULTURA DE CÉLULAS DE CANCRO DA MAMA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento de um dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biocinética, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Maria Miranda Botelho Teixeira e coorientação da Professora Doutora Ana Margarida Urbano (Universidade de Coimbra).

Ana Beatriz Dias Vilela

2023

"All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them."

Walt Disney

Agradecimentos

Chegando a esta etapa final do meu percurso acadêmico, quero expressar os meus agradecimentos a todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização deste percurso e, em especial, a finalização desta dissertação.

À Professora Doutora Ana Teixeira, orientadora desta dissertação, por todos os ensinamentos, todo o acompanhamento, atenção e disponibilidade, sem os quais nada disto teria sido possível.

À Professora Doutora Ana Urbano, por ter aceite colaborar neste projeto, por toda a disponibilidade e atenção dispensadas e por todo o rigor e trabalho que sempre nos exigiu. Grata pelo conhecimento e ensinamentos transmitidos.

Ao Carlos Soares um especial agradecimento por todo o acompanhamento desde o primeiro momento, todos os ensinamentos, toda a paciência e ajuda para que a concretização deste projeto fosse possível.

À Margarida por toda a atenção e tempo dispensado, toda a paciência e compreensão, um grande obrigado.

À Vanessa Fonseca que, para além de uma grande amiga, foi uma grande companheira durante todo este ano letivo, por todas as horas de estudo, todas as horas na sala de cultura, por estar sempre presente nos bons e nos maus momentos, um enorme obrigada.

Agradeço também aos meus pais, Judite Dias e Jorge Vilela, e ao meu namorado, Francisco Ramos, por acreditarem sempre no meu valor e por me ajudarem nos altos e baixos deste percurso.

Por fim, agradeço a todas as participantes que disponibilizaram o seu tempo, bem como, à Fernanda Silva pela disponibilização dos soros para que a concretização deste projeto fosse possível.

Índice

Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
I. Introdução	1
1.1. Aspetos gerais do cancro	3
1.2. Cancro da mama	4
1.3. Cancro da mama e a menopausa.....	7
1.4. Cancro e exercício físico	8
1.4.1. Mecanismos que associam o exercício físico e o cancro.....	9
1.4.2. Influência do exercício no sistema imunitário.....	13
1.5. Prescrição de exercício físico	14
1.6. Efeito de soro condicionado pelo exercício na cultura de células de cancro da mama.....	15
1.7. Objetivos.....	18
II. Materiais e métodos	19
2.1. Lista de materiais.....	21
2.2. Lista de equipamentos	22
2.3. Caracterização da amostra	22
2.4. Protocolo de intervenção	23
2.5. Protocolo de recolha	24
2.6. Material biológico.....	24
2.7. Cultura da linha celular MCF-7.....	25
2.7.1. Soluções utilizadas na cultura da linha celular MCF-7	25
2.7.2. Rotina de cultura de células.....	26

2.7.3. Contagem de células	27
2.7.4. Iniciação de uma cultura de células	29
2.7.5. Criopreservação das células	29
2.8. Curva de crescimento	30
2.9. Ensaio enzimático colorimétrico para quantificação de glicose.....	30
2.10. Ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB).....	31
2.11. Ensaio de lactato.....	32
2.12. Ensaio de citotoxicidade por SRB	32
III. Resultados e discussão	35
3.1. Caracterização da linha celular MCF-7	37
3.2. Caracterização bioquímica dos soros humanos	38
3.3. Caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na adesão celular.....	39
3.4. Caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na proliferação celular.....	40
3.5. Caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na produção de lactato.....	43
3.6. Impacto de soros condicionados pelo exercício físico na citotoxicidade da cisplatina.....	45
IV. Conclusão e perspectivas futuras	49
4. Conclusão e perspectivas futuras	51
Bibliografia.....	53

Lista de abreviaturas

4-AAP	4-animophenazona
ACS	American Cancer Society
ACSM	American College of Sports Medicine
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECIS	European Cancer Information System
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ER+	Cancro da mama com recetor hormonal de estrogénio
FBS	Soro fetal bovino (da designação inglesa “ <i>fetal bovine serum</i> ”)
FSH	Hormona folículo-estimulante
GOD	Glicose-oxidase
HER+	Cancro da mama com recetor epidérmico humano 2
HIEC	Ciclismo de resistência de alta intensidade (da designação inglesa “ <i>High-intensity endurance cycling</i> ”)
HIF-1α	Fator induzível por hipoxia-1 alfa
HIIT	Treino intervalado de alta intensidade (da designação inglesa “ <i>high intensity interval training</i> ”)
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina (da designação inglesa “ <i>insulin-like growth factor</i> ”)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (da designação inglesa “ <i>insulin-like growth factor 1</i> ”)
IGFBP-3	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3 (da designação inglesa “ <i>insulin-like growth factor binding protein 3</i> ”)
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
LDH	Lactato desidrogenase
LH	Hormona luteinizante (da designação inglesa “ <i>luteinizing hormone</i> ”)
LPCC	Liga Portuguesa Contra o Cancro
MCP-1	Proteína quimioatrante de monócitos-1
NF-κB	Fator nuclear κ B

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina com tampão fosfato (da designação inglesa “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PMF	Período menstrual final
POD	Peroxidase
PR+	Cancro com recetor hormonal de progesterona
RM	Repetição máxima
ROS	Espécies reativas de oxigénio (da designação inglesa “ <i>reactive oxygen species</i> ”)
S-DHEA	Sulfato de desidroepiandrosterona
SHBG	Globulina aglutinante da hormona sexual (da designação inglesa “ <i>sex hormone-binding globulin</i> ”)
SRB	Sulforhodamina
STRAW	Stages of Reproductive Aging Workshop
TCA	Ácido tricloroacético (da designação inglesa “ <i>trichloroacetic acid</i> ”)
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TNM	Tumores, nódulos e metástases
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

Resumo

Objetivo O principal objetivo do trabalho de investigação apresentado nesta dissertação foi a caracterização dos efeitos de soro condicionado por um programa de exercício físico combinado na adesão e proliferação de células de cancro da mama, em mulheres na pré e pós-menopausa. A investigação estudou ainda os efeitos de soro condicionado pelo exercício na produção de lactato e o impacto na citotoxicidade da cisplatina.

Metodologia Seis mulheres saudáveis e sedentárias (três na pré-menopausa e três na pós-menopausa, antes de iniciar a intervenção de exercício físico) realizaram um programa de exercício físico combinado de 16 semanas (exercícios de força e aeróbios). A linha celular utilizada nos trabalhos experimentais foi a MCF-7. A capacidade de adesão e proliferação das células de cancro da mama e o impacto na citotoxicidade da cisplatina, antes (M1) e após (M2) o programa de exercício físico, foram avaliadas através do ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB). A produção de lactato foi analisada através de ensaio enzimático.

Resultados No ensaio SRB após 24 horas de incubação a absorvância indicativa da adesão celular foi superior no M1 (0,085) quando comparada com o M2 (0,071), no entanto não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre momentos ($p = 0,116$). Na análise da proliferação celular, após 48 horas verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,028$) com uma absorvância indicativa da proliferação celular superior no M1 (0,178) quando comparada com o M2 (0,148). Às 72 horas não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o M1 (0,165) e o M2 (0,178) ($p = 0,753$). No ensaio de lactato não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,917$). A produção de lactato foi superior no M2 (0,400 mM) quando comparada com o M1 (0,386 mM). No ensaio de citotoxicidade com cisplatina por SRB observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,028$) após 24 horas de incubação, com uma absorvância indicativa da adesão celular superior no M2 (0,190) quando comparada com o M1 (0,176). Em todos os ensaios realizados, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre mulheres na pré e pós-menopausa.

Conclusão Os resultados mostram, de uma forma geral, que o programa de exercício físico combinado de 16 semanas conduziu a uma redução média da capacidade proliferativa celular, após 48 horas de incubação. No entanto o soro condicionado pelo

exercício crónico parece ter um efeito protetor contra a cisplatina verificando-se um aumento da capacidade de adesão celular das células MCF-7.

Palavras-chave Prevenção do cancro, tratamento coadjuvante do cancro, exercício físico, cancro da mama, cultura de células.

Abstract

Purpose The main objective of the research work presented in this dissertation was to characterise the effects of combined exercise-conditioned serum on breast cancer cell adhesion and proliferation in pre- and postmenopausal women. The research also studied the effects of exercise-conditioned serum on lactate production and the impact on cisplatin cytotoxicity.

Methodology Six healthy, sedentary women (three pre-menopausal and three post-menopausal, before starting the exercise intervention) underwent a 16-week combined exercise programme (strength and aerobic exercises). The cell line used in the experimental work was MCF-7. The adhesion and proliferation capacity of breast cancer cells and the impact on the cytotoxicity of cisplatin, before and after the exercise programme, was assessed using the sulforhodamine B (SRB) colourimetric assay. Lactate production was analysed using the lactate assay.

Results In the SRB test, after 24 hours of incubation, the absorbance indicating cell adhesion was higher in M1 (0.085) when compared to M2 (0.071), although there were no statistically significant differences between times ($p = 0.116$). When analysing cell proliferation, after 48 hours there were statistically significant differences between M1 and M2 ($p = 0.028$) with a higher absorbance indicating cell proliferation in M1 (0.178) compared to M2 (0.148). At 72 hours there were no statistically significant differences between M1 (0.165) and M2 (0.178) ($p = 0.753$). In the lactate test, there were no statistically significant differences between M1 and M2 ($p = 0.917$). Lactate production was higher in M2 (0.400 mM) compared to M1 (0.386 mM). In the SRB cytotoxicity test with cisplatin, statistically significant differences were observed between M1 and M2 ($p = 0.028$) after 24 hours of incubation, with a higher absorbance indicating cell adhesion in M2 (0.190) compared to M1 (0.176). In all the tests carried out, there were no statistically significant differences between pre- and post-menopausal women.

Conclusion The results generally show that the 16-week combined exercise programme led to an average reduction in cell proliferative capacity after 48 hours of incubation. However, serum conditioned by chronic exercise seems to have a protective effect against cisplatin, with an increase in the cell adhesion capacity of MCF-7 cells.

Keywords Cancer prevention, adjuvant cancer treatment, physical exercise, breast cancer, cell culture.

I. Introdução

1.1. Aspectos gerais do cancro

O cancro é uma designação geral para um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais em qualquer parte do corpo. Os tumores podem ser classificados como benignos ou malignos. Os tumores benignos não são considerados cancro e não se disseminam para os tecidos envolventes. Os tumores malignos são considerados cancro e têm a capacidade de invadir os tecidos e órgãos envolventes e perturbar as suas funções normais (1, 2).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é a segunda principal causa de morte a nível mundial, tendo sido responsável por 10 milhões de mortes no ano de 2020 (3). No mesmo ano, o cancro do pulmão foi responsável por 1 796 144 mortes, o cancro do fígado 830 180, estômago 768 793 e mama 684 986. No que diz respeito à incidência, o cancro da mama registou o número de novos casos mais elevado (2 261 419), seguido do cancro do pulmão (2 206 771), próstata (1 414 259) e cólon (1 148 515) (Tabela 1.1). Os dados apresentados são referentes à população mundial, para ambos os sexos e todas as idades (0 a 85+ anos) (4).

Lortet-Tieulent *et al* avaliaram a associação entre os níveis socioeconómicos e as taxas de incidência e mortalidade do cancro, concluindo que existe uma associação entre o aumento do desenvolvimento socioeconómico e uma taxa de incidência crescente. A associação para a taxa de mortalidade é menos óbvia (5). No caso específico do cancro da mama, se compararmos o continente europeu e o africano percebemos que apesar da taxa de incidência ser superior na Europa, em África morrem mais pessoas por cada 100 000 mil habitantes (4).

Tabela 1.1. | Estimativa das taxas globais de incidência e mortalidade para o cancro da mama por cada 100 000 mil habitantes. Os dados apresentados são referentes ao ano de 2020 e incluem ambos os sexos e todas as idades (0 a 85+ anos) (4). A taxa de letalidade representa um valor percentual que indica a proporção de mortes em função do número de diagnósticos. As medidas apresentadas são comumente utilizadas em epidemiologia e saúde pública.

	Taxa de incidência	Taxa de mortalidade	Taxa de letalidade
América do Norte	89,4	12,5	14,0
Europa	74,3	14,8	19,9
América Latina e Caraíbas	59,2	14,2	24,0
Ásia	36,8	11,9	32,3
África	40,7	19,4	47,7
Oceânia	87,8	14,7	0,167

Um estudo realizado pela *American Cancer Society* (ACS), em 2023, demonstrou que a taxa de mortalidade por cancro diminuiu progressivamente no período entre 2019 e 2020 (1,5%), contribuindo para uma redução global de 33% que tem vindo a acontecer desde 1991. A mesma organização estimou que, durante este período, foram evitadas 3,8 milhões de mortes (6).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de cancro podem ser divididos em duas categorias: intrínsecos e extrínsecos. Os fatores de risco intrínsecos incluem os erros aleatórios que ocorrem na replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN). Os fatores extrínsecos subdividem-se em dois grupos: fatores endógenos que incluem o envelhecimento biológico, predisposição genética, mecanismos de reparação do ADN, hormonas, fatores de crescimento, inflamações, entre outros; e fatores exógenos como a radiação, carcinogéneos químicos, vírus que provoquem tumores, maus hábitos de vida como fumar, dieta desequilibrada e ausência de exercício físico (7).

De um modo geral, e apesar das especificidades de cada diagnóstico, o exercício físico regular é uma ferramenta importante na diminuição do risco e no controlo do crescimento tumoral (8). Um estudo que incluiu 1,44 milhões de participantes revelou uma associação entre a atividade física e a redução de risco para 13 tipos diferentes de cancro (9). McTiernan A. sugeriu que a atividade física pode relacionar-se com a proteção contra o cancro através da modelação de alguns mecanismos, como: a diminuição de hormonas sexuais, hormonas metabólicas e inflamação e melhoria na função imunitária. (10).

1.2. Cancro da mama

O cancro da mama é o mais diagnosticado mundialmente com 2,26 milhões de casos registados estimados no ano de 2020 (11). Estima-se que, em 2070, o valor de casos registados irá aumentar para 4,4 milhões para ambos os sexos (12).

O carcinoma da mama tem a maior taxa de mortalidade no sexo feminino, tendo sido registadas 685 000 mortes no ano de 2020 (11). No caso português, esta também é a principal causa de morte relacionada com cancro nas mulheres (13). De acordo com o *European Cancer Information System* (ECIS), em 2010 morreram em média 73,5 mulheres entre os 45 e os 54 anos na região dos Açores, e 56,3 na região centro, não existindo dados referentes às regiões norte e sul (14).

A mama é uma glândula dividida em 15 a 20 lobos. Os lobos contêm lóbulos que, por sua vez, se dividem em ductos. O espaço entre os lóbulos e os ductos é preenchido

com gordura (Figura 1.1.) (15). O cancro da mama é um tumor maligno com origem nos ductos (85%) ou nos lóbulos (15%) da glândula mamária (16).

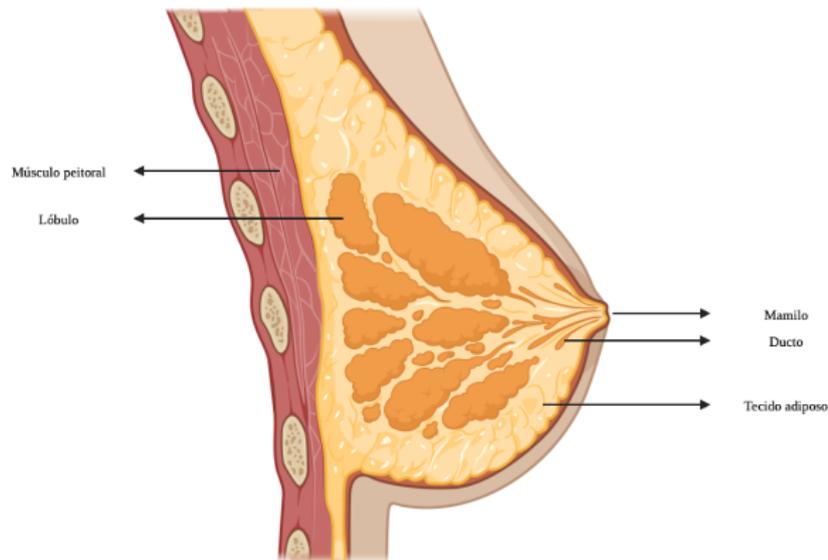


Figura 1.1. | Figura representativa da anatomia da glândula mamária. Na imagem estão representados o músculo peitoral, o lóbulo, o mamilo, o ducto e o tecido adiposo.

A patogénese do cancro da mama inclui fatores hormonais, genéticos e ambientais (17). A literatura enumera vários fatores de risco para o cancro da mama, incluindo:

1. Idade (o risco de desenvolver cancro da mama aumenta com o aumento da idade);
2. Historial pessoal de cancro da mama;
3. Historial familiar de cancro da mama;
4. Alterações genéticas em determinados genes (BRCA1, BRCA2, entre outros);
5. Primeira gravidez depois dos 31 anos;
6. Historial menstrual longo;
7. Terapia de substituição hormonal;
8. Raça (o risco de desenvolver o carcinoma da mama é superior para as mulheres caucasianas quando comparadas com mulheres latinas, asiáticas ou afro-americanas);
9. Radioterapia no peito;
10. Densidade da mama;
11. Obesidade após a menopausa;
12. Inatividade física;

13. Utilização de bebidas alcoólicas (18).

Para além destes, a utilização de contraceptivos hormonais contribui também para um aumento moderado de risco de desenvolver o carcinoma, considerando-se uma amplitude de risco baixa até aos 40 anos. A literatura descreve uma associação de risco mais elevado no tratamento hormonal combinado quando comparado ao tratamento apenas com estrogénios (19). Por outro lado, a idade precoce da primeira gravidez explica-se como fator de proteção contra o risco de desenvolver cancro da mama devido à máxima diferenciação do tecido epitelial, derivada da sequência estradiol, progesterona e prolactina (19).

A ACS definiu o aparecimento de um novo nódulo ou massa na mama como o sintoma mais comum do cancro da mama, incluindo também na lista: o inchaço da mama ou parte dela, ondulação na pele (“casca de laranja”), dor na mama ou mamilo, retração do mamilo, pele do mamilo ou peito vermelha, seca, a descamar e espessa, corrimento do mamilo (para além do leite materno) e gânglios linfáticos inchados debaixo do braço ou perto da clavícula (20).

O diagnóstico do cancro da mama pode ser realizado através de um exame clínico da mama, mamografia, ecografia, ressonância magnética ou biópsia, realizando-se, posteriormente, o estadiamento do carcinoma (21). O sistema de classificação mais utilizado no estadiamento do cancro da mama é o sistema de estadiamento de tumores, nódulos e metástases (TNM), que se baseia em características anatómicas e considera o tamanho do tumor (T), o estado nodal (N) e as metástases (M) (16). O cancro da mama pode ainda ser classificado com base em indícios moleculares e histológicos, categorizando-o em três grupos: cancro da mama com recetor hormonal de estrogénio (ER+) ou de progesterona (PR+), cancro da mama com recetor epidérmico humano 2 (HER2+) e cancro da mama triplo negativo (ER-, PR-, HER2-) (22).

A Liga Portuguesa Contra o Cancro (LPCC) recomenda que, para uma deteção precoce, mulheres com 40 ou mais anos, devem realizar uma mamografia anual ou de dois em dois anos e mulheres que tem um risco aumentado de desenvolver o carcinoma da mama devem falar com o seu médico para realizar uma mamografia antes dos 40 anos e agendar a frequência das seguintes (23).

O doente do carcinoma da mama tem à sua disposição várias opções de tratamento divididas em duas categorias: tratamento local e tratamento sistémico. O tratamento local inclui a cirurgia e a radioterapia e remove ou destrói as células de cancro da mama

localmente. O tratamento sistémico, que engloba a quimioterapia, a terapêutica hormonal e terapêuticas dirigidas, entra na corrente sanguínea atuando em todo o organismo. Na grande maioria dos casos, o doente recebe mais que um tratamento, dependendo sempre do desenvolvimento da doença (24).

1.3. Cancro da mama e a menopausa

O funcionamento do sistema genital feminino é caracterizado por uma atividade cíclica, desde a puberdade até à menopausa. A menopausa natural é definida como o fim da menstruação como resultado da perda da atividade folicular dos ovários (25,26). No momento em que ocorre o esgotamento dos folículos, os ovários tornam-se incapazes de responder aos níveis elevados da hormona folículo-estimulante (FSH) e os níveis de estrogénio diminuem (27). A menopausa, excluindo os casos em que é devido a causas patológicas ou fisiológicas óbvias, é considerada após 12 meses de amenorreia (28).

O *Stages of Reproductive Aging Workshop* (STRAW) centraliza a menopausa, definindo-a como 0. Para além disto, definem-se 5 fases que a precedem (a fase reprodutiva da mulher: -5, -4, -3; e a pré-menopausa: -2, -1) e duas fases posteriores (pós-menopausa: +1; +2) (29). O estágio -2 caracteriza-se com uma variação da duração dos ciclos e o estágio -1 por 60 ou mais dias de amenorreia (28). Na pós-menopausa, o estágio +1 representa os primeiros seis anos após o último período menstrual e o estágio +2, com duração variável, é contabilizado até à morte da mulher (28).

A perimenopausa traduz-se como “sobre ou em torno da menopausa”, iniciando-se no estágio -2 e terminando doze meses após o período menstrual final (PMF). A expressão “climatério” é considerada um termo popular mais vago que deve ser utilizado como sinónimo de perimenopausa na comunicação com pacientes e/ ou na imprensa não especializada, não devendo ser utilizado em artigos científicos (29).

O cancro da mama é reconhecido como dependente de hormonas (30), sendo o tecido mamário influenciado pelas hormonas estradiol e progesterona durante toda a vida reprodutiva (19). Segundo a literatura, um aumento de peso durante a vida adulta ou o excesso de gordura corporal aumenta o risco de desenvolver o carcinoma após a menopausa. Pelo contrário, a perda de peso poderá diminuir o risco (31). A obesidade apresenta-se como fator de risco na pós-menopausa por efeito do aumento dos níveis de estrogénios, resultantes do processo de aromatização da testosterona e dos andrógenos adrenais no tecido adiposo (19). Para além disto, a resistência à insulina resultante poderá também contribuir para este risco acrescido (19). A obesidade aumenta o risco de

desenvolver cancro da mama assim como intensifica o risco de recorrência e de morte associada ao cancro (32).

A ciência aponta que as mulheres com mais de 50 anos representam cerca de 80% de todos os casos de cancro da mama, traduzindo-se numa frequência nove vezes superior quando comparadas com mulheres mais jovens (33). Num estudo que envolveu 160 000 mulheres observou-se uma associação positiva entre o risco de cancro da mama e a testosterona em mulheres na pós-menopausa; uma associação inversa de risco para a globulina aglutinante da hormona sexual (SHBG) em mulheres na pós-menopausa; e uma associação positiva de risco para o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) tanto em mulheres na pré como na pós-menopausa (17).

Vários estudos, envolvendo mulheres na pós-menopausa, demonstraram que o controlo de fatores de risco modificáveis tais como: o índice de massa corporal (IMC), álcool, exercício, nutrição e tabagismo podem reduzir o risco de desenvolver o carcinoma da mama (19).

1.4. Cancro e exercício físico

A atividade física define-se como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que envolvam o gasto energético, como por exemplo a execução de tarefas domésticas e atividades de lazer. O exercício físico é uma atividade planeada e estruturada com o objetivo de manter ou melhorar as componentes físicas, como por exemplo uma aula de grupo, uma corrida e/ou uma caminhada (34). Por outro lado, um comportamento sedentário é caracterizado por um gasto energético $\leq 1,5$ METs numa postura sentada, reclinada ou deitada (35).

A associação entre o exercício físico e um risco reduzido de desenvolver cancro tem vindo a ser amplamente estudada, tendo sido encontradas algumas evidências (36). Uma meta-análise concluiu que pessoas mais ativas tem um risco inferior de desenvolver o carcinoma da mama quando comparadas com as menos ativas (37). Para além disto, mulheres que fazem exercício físico durante três a quatro horas por semana, de intensidade moderada ou superior, têm um risco reduzido de 30–40% de desenvolver cancro da mama quando comparadas com mulheres sedentárias (10).

Um estudo demonstrou que o controlo tumoral por exercício físico pode provocar uma redução de 67% na taxa de crescimento (38). Corroborando com os dados referidos anteriormente, estudos *in vitro* demonstraram uma inibição de 10–15% na proliferação

das células cancerígenas (38–40). A discrepância de valores pode ser explicada pelo facto de os estudos *in vitro* refletirem o efeito de apenas uma sessão de exercício, contrariamente ao que acontece *in vivo*, onde o tumor é submetido recorrentemente ao exercício físico (8).

O exercício físico a longo prazo melhora o nível de aptidão física, reduz a percentagem de massa gorda, aumenta a percentagem de massa magra, diminui as concentrações basais de hormonas sexuais circulatórias, hormonas metabólicas e fatores inflamatórios e diminui ainda os fatores de risco conhecidos do carcinoma da mama (10). Para além disto, o exercício físico poderá também diminuir a fadiga, melhorar a qualidade de sono e inculcar um sentido de empoderamento nos doentes (41). O exercício agudo aumenta, transitoriamente, hormonas circulantes, citocinas e células imunitárias (42).

Hojman *et al* mostraram que o exercício físico: (i) controla a progressão do cancro modulando fatores intrínsecos do tumor (taxa de crescimento, capacidade de formar metástases, metabolismo do tumor e imunogenicidade do tumor); (ii) regula o crescimento interagindo com fatores sistémicos; (iii) alivia efeitos adversos do cancro e do seu tratamento; (iv) e melhora a eficácia do tratamento do cancro (8).

1.4.1. Mecanismos que associam o exercício físico e o cancro

i. Adiposidade

Estudos epidemiológicos afirmam que cerca de 15–20% das mortes por cancro podem ser atribuídas à obesidade (43). O excesso de peso e a obesidade, demonstrados tanto pelo IMC, como pela circunferência da cintura e pela relação cintura-quadril tem vindo a ser referenciados como fator de risco para desenvolver cancro da mama, principalmente em mulheres na pós-menopausa, tal como referido anteriormente (44). Os cancros da mama ER+ e PR+ são os mais relevantes na associação de mulheres na pós-menopausa e a adiposidade (45). Para além disto, a obesidade associa-se também a níveis inferiores de sobrevivência após a conclusão do tratamento. Uma meta-análise que considerou 221 conjuntos de dados provenientes de 141 estudos demonstrou que o rácio de risco de incidência de cancro da mama aumenta 1,12 por cada 5 kg/m² em mulheres na pós-menopausa (46).

A adiposidade pode associar-se ao desenvolvimento e progressão do cancro da mama através de três mecanismos: resistência à insulina, aumento de adipocinas e inflamação crónica, e hipoxia do tecido adiposo (44).

A insulina pode ser associada ao risco de desenvolver cancro da mama devido a três mecanismos: a ativação da própria via de insulina, a ativação da via IGF e a alterações da regulação das hormonas sexuais endógenas (47).

A proteína IGF-1 inibe a apoptose, promove o crescimento celular e aumenta a angiogénese celular, promovendo o crescimento do tumor e agravando o risco de cancro (48,49). A proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3 (IGFBP-3) tem um comportamento inverso, embora não tenha sido demonstrado em todos os estudos (49). A literatura descreve que o exercício físico aumenta os níveis de IGFBP-3 e diminui os níveis de IGF-1 (Figura 1.2.) (50).

A insulina provoca também alterações na regulação das hormonas sexuais endógenas, aumentando os níveis de estrogénio por aromatase (51,52). Para além disto, a insulina e o IGF-1 inibem a secreção hepática de SHBG, aumentando o estrogénio disponível (51–53). A atividade física, incluindo exercícios aeróbios e de resistência, melhora a sensibilidade à insulina, reduz os níveis de insulina circulante, aumenta o consumo de glicose através da ativação do músculo esquelético e reduz a síntese de ácidos gordos (Figura 1.2.) (54).

As adipocinas que mais influenciam o desenvolvimento do cancro da mama são a leptina, a adiponectina, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (55). A leptina é uma hormona peptídica produzida, maioritariamente, pelos adipócitos. Esta hormona está presente no tecido mamário e tem elevada expressão no cancro da mama, atuando como um fator de crescimento e regulador da proliferação celular (56,57). Assim, conseguimos perceber a associação que é feita entre cancros dependentes de hormonas, como o cancro da mama e do ovário, com níveis mais elevados de leptina e a obesidade (58). A adiponectina é também uma hormona peptídica secretada pelos adipócitos. Esta hormona, contrariamente à leptina, reduz a proliferação celular e inibe a migração das células de cancro da mama. Para além disto, a adiponectina tem também efeitos anti-inflamatórios (57,59,60) e é um forte indicador da sensibilidade à insulina (60).

O exercício físico, independentemente da perda de massa gorda, reduz os níveis séricos da leptina e aumenta os níveis de adiponectina (Figura 1.2.) (61). Um estudo com o objetivo de determinar se uma intervenção de 16 semanas de exercício físico alteraria o fenótipo dos macrófagos do tecido adiposo em sobreviventes obesas pós-menopáusicas de cancro da mama conclui que o exercício aeróbio e de resistência atenua a inflamação do tecido adiposo na população em análise (62).

Os adipócitos têm a capacidade de expandir o seu diâmetro celular até 20 vezes, provocando hipoxia grave no microambiente circundante (63). O ambiente hipoxico aumenta a expressão do fator induzido por hipoxia-1 alfa (HIF- α) nos adipócitos, o que regula diretamente a produção de fatores pró-inflamatórios como o TNF- α , a IL-6 e a proteína quimioatratante de monócitos-1 (MCP-1) (64).

ii. Hormonas sexuais

O estrogénio é uma hormona sexual feminina produzida nos ovários e no tecido adiposo e transportada para os tecidos e órgãos alvo ligado a albuminas e à SHBG (65). Esta hormona tem a capacidade de induzir a proliferação celular e estimular o desenvolvimento de tumores.

Um estudo com vista à investigação da relação entre o exercício e os níveis de hormonas sexuais séricas submeteu mulheres na pós-menopausa com excesso de peso e obesas a uma intervenção de 12 meses de dieta hipocalórica e exercício físico. Os autores concluíram que a perda de peso relacionada com o exercício reduz significativamente os níveis de estrogénios séricos e de testosterona livre, podendo estabelecer uma ligação entre a perda de peso e a diminuição de risco de desenvolver o carcinoma da mama (Figura 1.2.) (66).

Na pré-menopausa, mulheres fisicamente ativas, tanto saudáveis como obesas, têm um nível de estradiol menor (67). O decréscimo do IMC aumenta a concentração de SHBG (68). Na pós-menopausa, tal como na pré-menopausa, a atividade física surge associada a uma diminuição significativa de estrogénio e a um aumento de SHBG (69,70), reduzindo significativamente o risco de cancro da mama nesta população.

i. Stress oxidativo e alterações epigenéticas

A literatura apresenta cada vez mais provas do papel do stress oxidativo na progressão de vários tumores, incluindo o cancro da mama. Este estado resulta de uma perturbação do equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes (75).

A principal função carcinogénica do stress oxidativo é a alteração genética, gerada, particularmente, pela reação dos radicais livres com as pirimidinas, purinas e proteínas da cromatina e, conseqüente, alteração do padrão de expressão dos genes e reforço do potencial de mutação. O stress oxidativo provoca alterações epigenéticas,

como a hipometilação do ADN, ou seja, conduz a um aumento da expressão de genes, levando a uma instabilidade genómica como a ativação de proto-oncogenes. Para além disto, provoca ainda a hipermetilação em certas regiões do ADN, como a região do promotor de genes supressores do tumor, resultando no silenciamento de genes (72).

O stress oxidativo pode provocar angiogénese no cancro da mama e aumentar o fornecimento de sangue ao carcinoma ao instigar a vasodilatação e aumentar a migração das células tumorais, aumentando o risco de invasão e metástases (54).

A atividade física, especialmente a extenuante, conduz a uma produção de ROS e, conseqüentemente, a um aumento no stress oxidativo no ADN (73). Os elevados níveis oxidativos podem promover a formação de tumores através da indução de danos no ADN, da produção de citocinas pró-inflamatórias (74) e a ativação da via do fator nuclear kB (NF-kB) (75). No entanto, quando o exercício é regular, o organismo tem capacidade adaptativa, conseguindo eliminar o estado de stress oxidativo antes que este cause danos nas estruturas celulares (44). A bibliografia descreve que indivíduos treinados, ou seja, com níveis de enzimas antioxidantes mais elevadas, estarão potencialmente reforçados contra agentes cancerígenos oxidantes ambientais e ingeridos (76). A atividade física aumenta o número de mitocôndrias no músculo esquelético, permitindo ao organismo tornar-se mais resistente ao stress oxidativo. As reduções no stress oxidativo, conseqüentes da prática de exercício físico regular, podem ser benéficas para prevenir a progressão do tumor e das metástases, tanto em células cancerosas como no estroma tumoral circundante (77).

O tipo, a duração e a intensidade do exercício tem um elevado impacto no risco de desenvolver o carcinoma da mama, sendo que o exercício regular de intensidade moderada atua preventivamente na carcinogénese, uma vez que beneficia as enzimas antioxidantes e aumenta expressão dos genes relacionados com a inflamação. Pelo contrário, o exercício de alta intensidade em tecidos não preparados, pode provocar um aumento significativo da produção de ROS (78).

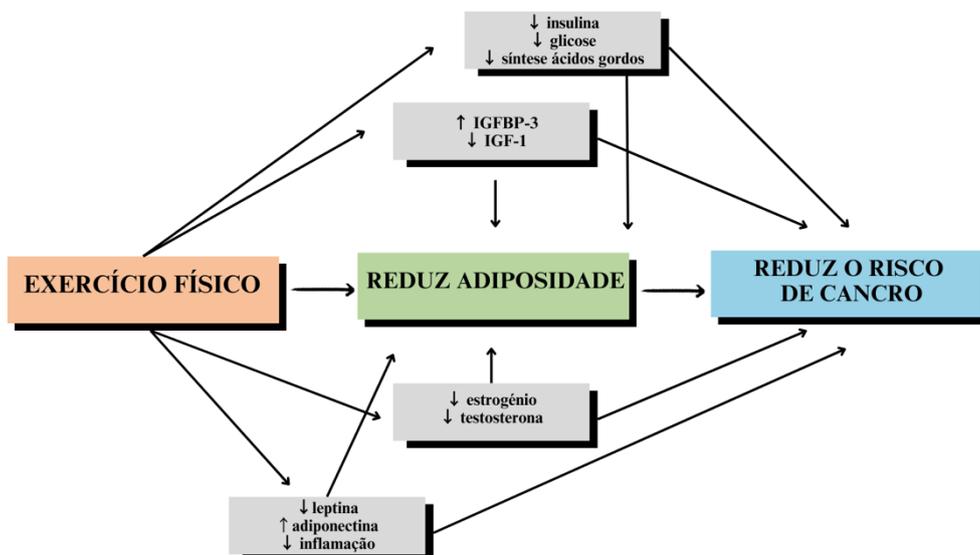


Figura 1.2. | Mecanismos que associam o exercício físico, a adiposidade e o cancro. O exercício físico pode provocar uma redução na adiposidade e, conseqüentemente, reduzir os níveis de insulina, glicose, ácidos gordos, IGF-1, estrogênio, testosterona, inflamação e leptina e aumentar os níveis de IGFBP-3 e adiponectina. As alterações provocadas reduzem o risco de desenvolver cancro.

1.4.2. Influência do exercício no sistema imunitário

O sistema imunitário é um conjunto de órgãos, tecidos e células responsáveis pelo combate a microrganismos invasores, impedindo assim o desenvolvimento de doenças. Este sistema é composto por órgãos linfóides primários: medula óssea e o timo; órgãos linfóides secundários: baço e os gânglios ou nódulos linfáticos; e células: leucócitos, linfócitos e monócitos (79).

O exercício físico mobiliza e redistribui células imunitárias citotóxicas que vão atuar contra o tumor, circulando no sangue até aos tecidos periféricos. Para além disto, o exercício restringe a sinalização das vias inflamatórias nas células imunitárias mieloides e regula a inflamação sistémica aguda e crónica. O exercício agudo e os fatores induzidos por este inibem o crescimento do tumor (80). O exercício pode também reduzir a capacidade do tumor se desenvolver através do músculo esquelético. As miocinas libertadas pelo músculo induzidas pelo exercício podem influenciar a atividade das células imunitárias através da libertação de citocinas reguladoras como a IL-6, IL-7 e IL-15 (8). Para além disto, a mobilização e redistribuição das células *natural killer* (NK) e T citotóxicas também dependem da libertação de epinefrina e IL-6 durante o exercício (38).

Um estudo que avaliou a função do exercício na supressão imunitária e na progressão do cancro da mama triplo negativo em ratos, conclui que o exercício pode retardar a progressão do tumor. A investigação sugeriu que o exercício físico pode restabelecer um ambiente imunitário favorável com implicações positivas no tratamento de cancro da mama (81).

1.5. Prescrição de exercício físico

De acordo com as diretrizes da ACS para a prevenção de cancro, os adultos devem realizar 150 a 300 minutos por semana de atividade física de intensidade moderada, 75 a 150 minutos de atividade física de intensidade vigorosa, ou uma combinação equivalente (31).

Os treinos de resistência são maioritariamente realizados em máquinas de treino de força, duas vezes por semana, com carga 50–80% de uma repetição máxima (RM), com duração de 60 minutos e incluindo duas ou três séries com 8 a 12 repetições para cada grupo muscular. Um artigo de revisão mostrou que este tipo de treino é seguro, não afeta negativamente o desenvolvimento ou agravamento do linfedema e contribui para a melhor qualidade de vida dos pacientes (82).

Os autores Scharhag-Rosenberger *et al.* investigaram se na prescrição de exercício físico, a intensidade para adultos saudáveis, de acordo com o *American College of Sports Medicine* (ACSM), pode ser adaptada a sobreviventes de cancro de mama. Estes autores concluíram que a frequência cardíaca de reserva incrementa a intensidade do treino, o VO_{2max} diminui ligeiramente e a frequência cardíaca máxima é válida (83).

Uma outra revisão sistemática avaliou o efeito do exercício físico na fadiga e na qualidade de vida, durante um curso de radioterapia adjuvante, em pacientes de cancro da mama em diferentes estádios de diagnóstico. Apesar de ser necessário algum cuidado na análise dos resultados, devido a algumas limitações, este estudo conclui que o exercício durante a radioterapia adjuvante é benéfico na gestão da fadiga, valorizando o treino acompanhado e a combinação de exercícios aeróbios e de resistência. A investigação relativa aos parâmetros ideais para a prescrição de exercício físico e a melhoria da qualidade de vida ainda é necessária (84).

No que diz respeito aos benefícios do exercício físico durante e após o tratamento do cancro, podemos enumerar que reduz os efeitos secundários do tratamento, reduz a mortalidade (cancro colorretal, mama e próstata), aumenta a sobrevivência e reduz a

incidência. Para além disto, tem um impacto positivo na saúde mental dos pacientes (reduz a ansiedade e a depressão e aumento dos níveis de felicidade), reduz a fadiga, aumenta a aptidão aeróbia e a força da parte superior do corpo, reduz o índice de massa corporal e a massa gorda e aumenta a qualidade de vida (85).

1.6. Efeito de soro condicionado pelo exercício na cultura de células de cancro da mama

Num estudo conduzido por Baldelli *et al* utilizaram uma amostra de 12 mulheres sedentárias saudáveis de $21 \pm 0,8$ anos e realizaram um programa de treino intervalado de alta intensidade (HIIT) de nove semanas e duas sessões de ciclismo de resistência de alta intensidade (HIEC), antes e após o programa, para estudar o efeito do exercício na capacidade proliferativa de uma linha celular de cancro da mama (MDA-MB-231). O soro condicionado pelo exercício foi recolhido imediatamente, 4 horas e 24 horas após a sessão de exercício. Os resultados mostram que o soro condicionado pelo exercício físico conduz a uma redução na capacidade proliferativa das células de cancro da mama quando comparado com o soro recolhido em repouso após 48 horas de incubação (86). Os autores descrevem ainda que os resultados foram bastante semelhantes para os soros recolhidos, imediatamente, 4 e 24 horas após o exercício (Tabela 1.2).

No estudo de Mauro De Santi *et al.*, três mulheres sedentárias saudáveis na pré-menopausa de $43,3 \pm 9,8$ anos foram submetidas a uma única sessão de exercício aeróbio de intensidade moderada a vigorosa, de 65 minutos, numa passadeira, para avaliar o efeito do exercício na capacidade das células MDA-MB-231 formar colónias (87). O soro condicionado pelo exercício foi recolhido imediatamente e duas horas após a sessão de exercício. Este estudo mostrou que os soros condicionados por uma sessão de exercício físico (t1 e t2) reduziram, de forma estatisticamente significativa, a capacidade das células MDA-MB-231 de formar colónias em ágar mole, comparativamente aos soros pré-exercício (Tabela 1.2).

Dethlefsen *et al.* selecionaram uma amostra de 7 mulheres saudáveis ($24,6 \pm 1$ anos) e 20 mulheres com cancro da mama ($48,5 \pm 7,3$ anos) para estudar a viabilidade das células de cancro da mama (MCF-7 e MDA-MB-231) quando submetidas a soro condicionado pelo exercício físico (88). As mulheres saudáveis foram submetidas a um treino de duas horas a 55% VO_2 máximo num cicloergómetro (88). As mulheres com cancro da mama realizaram também uma sessão de 2 horas mas com 30 minutos de aquecimento, 60 minutos treino de corpo inteiro e 30 minutos de treino de alta intensidade

(88). O soro foi recolhido antes, após uma hora de exercício e no final da sessão. Esta investigação conclui que mudanças sistemáticas que ocorrem durante o exercício podem reduzir a viabilidade das células de cancro da mama (88) (Tabela 1.2).

Por fim, os mesmos autores, em 2016, utilizaram uma amostra de 20 sobreviventes de cancro da mama ($49,5 \pm 7,39$) incluídas no programa “*Body and Cancer*” do hospital universitário de Copenhaga para estudar o efeito de exercício na viabilidade das células de cancro da mama (MCF-7 e MDA-MB-231). O programa incluía um programa de exercício de seis semanas com três sessões semanais para os pacientes submetidos ao tratamento de quimioterapia. Os autores definiram que os participantes deveriam estar há pelo menos sete dias sem administração de quimioterapia e livres de infeções nos últimos 14 dias. Para além disto, a sessão de exercício foi realizada a meio do programa de treino de seis semanas. A sessão de exercício tinha duração de duas horas, com 30 minutos de aquecimento, 60 minutos de treino de resistência e 30 minutos de exercício de alta intensidade num cicloergómetro (89). As amostras de soro foram recolhidas antes e imediatamente após a sessão. A investigação encontrou uma diminuição na viabilidade das células de cancro da mama quando submetidas ao soro condicionado pelo exercício físico quando comparadas com o soro recolhido em repouso (89) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Síntese da pesquisa sistemática de artigos sobre os efeitos de soros condicionados pelo exercício na viabilidade de uma cultura de células de cancro da mama.

ESTUDO	LINHA CELULA R	AMOSTRA			INTERVENÇÃO	GRUPOS	ENSAIOS	RESULTADOS
		N	Tipo	Idade				
BALDELLI ET AL. 2020	MDA- MB-231	12	Mulheres sedentárias saudáveis	21 ± 0,8	Programa de treino HIIT de 9 semanas e 2 sessões de ciclismo de resistência de alta intensidade (HIEC) antes e após o programa.	Grupo de controlo- 5% de soro pré-exercício. Grupo de exercício- 5% de soro recolhido imediatamente, 4 horas e 24 horas após o exercício.	Ensaio de exclusão do corante azul tripano; ensaio de cultura celular tridimensional em ágar mole.	Os autores concluíram que todos os soros condicionados ao exercício conduziram a uma redução média da capacidade proliferava celular em comparação com o soro recolhido em repouso. Os resultados foram bastante semelhantes para os soros recolhidos, imediatamente, 4 e 24 horas após o exercício.
MAURO DE SANTI ET AL 2019	MDA- MB-231	3	Mulheres sedentárias saudáveis na pré-menopausa	43,3 ± 9,8	Única sessão de exercício físico de 65 minutos (20 minutos- 42% FCR, 45 minutos- 60% FCR).	5% de soro humano pré ou pós exercício.	Ensaio MTS e ensaio de ágar mole.	Este estudo mostrou que os soros condicionados pelo exercício físico (t1 e t2) reduzem de forma estatisticamente significativa a capacidade das células MDA-MB-231 de formar colónias em ágar mole, comparativamente aos soros pré-exercício (p < 0,01; p < 0,001).
DETHLEFSEN ET AL. 2017	MDA- MB-231, MCF-7	27	7 mulheres saudáveis	24,6 ± 1,0	Treino de duas horas a 55% VO ₂ máximo num cicloergómetro.	Grupo de controlo (10% de soro pré-exercício), grupo de exercício 1 (10% de soro 1 hora de exercício) e grupo de exercício 2 (10% soro recolhido após o término do exercício).	Ensaio de viabilidade das células CellTiter-fluor	Alterações sistemáticas que ocorrem durante o exercício podem reduzir a viabilidade das células de cancro da mama.
			20 mulheres com cancro da mama	48,5 ± 7,3	Sessão de 2 horas com 30 minutos de aquecimento, 60 minutos treino de corpo inteiro	Grupo de controlo (soro pré-exercício) e o outro grupo (soro recolhido imediatamente após o exercício).		
DETHLEFSEN ET AL. 2016	MDA- MB-231, MCF-7	20	Sobreviventes de cancro da mama	49,5 ± 7,3	Sessão de exercício de duas horas com 30 minutos de aquecimento, 60 minutos de treino de resistência e 30 minutos de exercício de alta intensidade.	Grupo de controlo (10% de soro pré-exercício) e um outro grupo (10% de soro após 2 horas de exercício).	Ensaio de viabilidade das células CellTiter-fluor	As alterações sistemáticas que ocorrem durante o exercício reduzem a viabilidade das células de cancro da mama.

1.7. Objetivos

O objetivo deste estudo é analisar a viabilidade celular de uma linha celular de cancro da mama cultivada com meio de cultura suplementado com soros humanos condicionados por um programa de exercício combinado de 16 semanas. A investigação pretende, desta forma, caracterizar os efeitos de soro condicionado pelo exercício físico combinado na adesão e proliferação de células de cancro da mama, em mulheres na pré e pós-menopausa e ainda, os efeitos de soro condicionado pelo exercício na produção de lactato e o impacto na citotoxicidade da cisplatina.

Para abordar as questões apresentadas utilizámos a linha celular MCF-7 e soros condicionados pelo exercício físico de mulheres na pré e na pós-menopausa.

II. Materiais e métodos

2.1. Lista de materiais

Todos os materiais utilizados no trabalho experimental descrito na presente dissertação estão descritos na Tabela 2.1., incluindo o fabricante, a referência e o fornecedor de cada um deles.

Tabela 2.1. | Lista dos materiais utilizados no trabalho experimental descrito na dissertação.

Material	Fabricante	Referência	Fornecedor
Ácido acético 99–100%	GPR RECTAPUR®	20103.295	VWR International, Portugal
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , > 99%)	Sigma-Aldrich®	E5134	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Ácido tricloroacético (TCA, C ₂ HCl ₃ O ₂)	Sigma-Aldrich®	T6399	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Azul tripano 0.4% (w/v) (TB, C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	Sigma-Aldrich®	T8154	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Dimetilsulfóxido (DMSO, C ₂ H ₆ OS, ≥ 99.9%)	Sigma-Aldrich®	472301	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Kit glicose	LTA Srl	CC01900	
Kit L-Lactato (LAC)	Radox	LC2389	Irlandox Laboratories Lda., Porto, Portugal
Material plástico descartável rotineiramente utilizado em cultura celular (frascos de cultura, placas multipoços, tubos de centrifugação e pipetas serológicas)	Orange Scientific		Instituto Superior Técnico, Coimbra
Meio RPMI-1640	Sigma-Aldrich®	R6504	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Placas para cultura celular - 96 poços	Frilabo	4430100N	Frilabo, Maia, Portugal
Solução de tripsina de pâncreas suíno, 2,5% (m/v)	Sigma-Aldrich®	T4549	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Soro fetal bovino (FBS)	Life Technologies™	10270-106	Alfagene®, Carcavelos, Portugal
Sulforhodamina B (C ₂₇ H ₂₉ N ₂ NaO ₇ S ₂ Teor de corante 75%)	Sigma-Aldrich®	230162	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra, Portugal
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, (HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	Corning®	MDTC61-233-RR	VWR International, Portugal
Unidade de filtração seringa 0.22 µm		SLGV033RB	Frilabo, Maia, Portugal
Unidades de filtração descartáveis com membranas PES Nalgene™ Rapid-Flow™	Thermo Scientific™	(127-0020)	Frilabo, Maia, Portugal

2.2. Lista de equipamentos

Todos os equipamentos utilizados no trabalho experimental descrito na presente dissertação estão descritos na Tabela 2.2., incluindo o fabricante, o modelo e o fornecedor de cada um deles.

Tabela 2.2. | Lista de todos os equipamentos utilizados no trabalho experimental descrito na dissertação.

Material	Fabricante	Modelo	Fornecedor
Autoclave de bancada	Frilabo	HS-2522SD	Frilabo, Lda., Porto, Portugal
Balança (precisão)	Acculab	ALC-210.4	Sartorius, S.A., Lisboa, Portugal
Banho de água	Clifton®	NEI-14 79004	Frilabo, Lda., Porto, Portugal
Câmara de fluxo	Olympus	EP50	Olympus, Central Valley, USA
Centrifugadora de bancada	Heraeus	Labofuge 400R	
Espectrofotómetro visível	Thermo Scientific™	Genesys 20 4001/4	VWR International Lda., Carnaxide, Portugal
Espectrofotómetro visível por UV	Thermo Scientific™	Nanodrop T042	VWR International Lda., Carnaxide, Portugal
Incubadora CO ₂	Frilabo	09053506	Sanyo, San Diego, USA
Leitor de microplaca	BioTek	µQuant	IZASA Portugal, Carnaxide, Portugal
Medidor de pH	SevenCompact	S220	Mettler Toledo, Porto, Portugal
Microplaca rotadora	Digisystem Laboratory Instruments Inc.	DSR 2800V	Reagente 5 Química e Eletrónica Lda. Porto
Microscópio ótico	Olympus	CKX53	Olympus, Central Valley, USA
Mr. Frosty™ contentor de congelação	Thermo Scientific™	5001-001	VWR International Lda., Carnaxide, Portugal
Recipiente de azoto líquido	Cryo Diffusion S.A.S.	B2048	Cryo Diffusion S.A.S., Lery, France
Sistema de purificação de água	Millipore S.A.	Slimplicity® SIMS50000	Interface, Equipamento e Técnica Lda.,

2.3. Caracterização da amostra

A amostra utilizada era constituída por seis participantes do sexo feminino, todas fisicamente inativas de acordo com os critérios da OMS (90), trabalhadoras a tempo inteiro com ocupações sedentárias e disposição para manter o seu padrão nutricional atual (Tabela 2.3). Das seis mulheres ($51,17 \pm 7,52$ anos), três (50%) estavam na pré-

menopausa ($46,33 \pm 5,69$ anos) e três (50%) na pós-menopausa ($56,00 \pm 6,24$ anos), antes de iniciar a intervenção de exercício físico (Tabela 2.4) (91).

Tabela 2.3. Critérios de inclusão e exclusão para os participantes (91).

Inclusão	<ol style="list-style-type: none"> Mulheres entre os 40 e os 64 anos Fisicamente inativas de acordo com os critérios da OMS Trabalhadores a tempo inteiro com ocupações sedentárias Disposição para manter o seu padrão nutricional atual e participar em todas as avaliações de teste
Exclusão	<ol style="list-style-type: none"> Diagnóstico de doença crónica (diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e pulmonares) Condições psiquiátricas ou cognitivas que necessitem de tratamento crónico (desordem depressiva) Toma de alguma medicação regular que possa interferir com os resultados do estudo Limitações que impeçam a prática de exercício Historial de insuficiência cardíaca e/ou enfarte do miocárdio Tensão arterial incontrolada ou anormal Participação em qualquer ensaio de intervenção no prazo de seis meses antes do rastreio Participação atual noutra experiência de intervenção Fumador Falta de consentimento

Tabela 2.4. Idade e caracterização antropométrica da amostra utilizada nos trabalhos desenvolvidos na presente dissertação. Os resultados representam o momento antes (M1) e após (M2) o programa de exercício físico de 16 semanas. (91)

CÓDIGO	IDADE (ANOS)	MASSA CORPORAL M1 (KG)	MASSA CORPORAL M2 (KG)	ESTATURA (M)	IMC M1 (KG/M²)	IMC M2 (KG/M²)
DFS002	40	59,90	61,40	1,59	23,69	24,29
DFS005	48	45,70	44,90	1,54	19,27	18,93
DFS009	51	83,10	83,40	1,56	34,15	34,27
DFS011	54	59,70	56,60	1,55	24,85	23,56
DFS023	63	76,80	75,60	1,57	31,16	30,67
DFS033	51	65,60	65,30	1,56	26,96	26,83

2.4. Protocolo de intervenção

O programa de exercício físico, descrito na Tabela 2.5, teve uma duração de 16 semanas, com um total de 48 sessões de exercício. As referidas sessões incluíram exercícios de força e aeróbios. Apenas os participantes com uma adesão igual ou superior a 80% dos treinos foram considerados para análise. Todas as sessões de exercício foram realizadas num único local e supervisionadas por dois instrutores.

Tabela 2.5. | Estruturação do programa de exercício físico realizado durante 16 semanas pelos participantes cujo soro foi utilizado na realização de todos os ensaios desta dissertação (tabela adaptada de Silva et al. (96).

Frequência e duração	Intensidade				Tipo
	Semana 1-4	Semana 5-8	Semana 9-12	Semana 13-16	
3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira). Parte fundamental da sessão de 60 min: 30 min de trabalho aeróbio + 30 min de trabalho de resistência	Exercícios de resistência: 1-2 séries de 10-15 repetições a 45-65% 1 RM; e RPE de 5-6 na escala de Borg CR-10.	Exercícios de resistência: 2 séries de 10-12 repetições a 60-75% 1 RM; e RPE de 5-6 na escala de Borg CR-10.	Exercícios de resistência: 2 séries de 8-12 repetições a 70-85% 1 RM; e RPE de 6-7 na escala de Borg CR-10.	Exercícios de resistência: 2 séries de 6-12 repetições a 70-90% 1 RM; e RPE de 7-8 na escala de Borg CR-10.	Métodos de carga: constante e progressivo. Exemplos de exercícios: prensa de peito, elevação lateral dos braços, remada curvada, <i>two-arm row</i> , flexões de braços, agachamento frontal, levantamento de terra, elevação do calcanhar, exercícios de abdominais. Exercício contínuo, intervalado ou variado contínuo. Exemplos: caminhada rápida, correr, step, treino em circuito.
	Exercício aeróbio: 60-75% da FCR; e RPE de 5-6 na escala de Borg CR-10.	Exercício aeróbio: 70-85% da FCR; e RPE de 5-6 na escala de Borg CR-10.	Exercício aeróbio: 80-90% da FCR; e RPE de 6-7 na escala de Borg CR-10.	Exercício aeróbio: 80-95% da FCR; e RPE de 7-8 na escala de Borg CR-10.	

Abreviaturas: min, minutos; RM, repetição máxima; RPE, percepção subjetiva de esforço (da designação inglesa “rate of perceived exertion”); FCR, frequência cardíaca de reserva. Na escala de Borg CR-10 o valor 0 significa extremamente fácil e 10 extremamente difícil.

2.5. Protocolo de recolha

As amostras de sangue foram recolhidas com os participantes sentados, a partir da veia antecubital, em repouso e após um jejum de 12 horas durante a noite. Os participantes foram aconselhados a evitar esforços físicos extremos 24 horas antes da colheita de sangue (91). Após centrifugação do sangue colhido a 3000 rpm durante 15min, o soro foi recolhido e armazenado a -80°C.

2.6. Material biológico

A linha de células MCF-7 (Figura 2.1) foi utilizada em todas as experiências descritas nesta dissertação. As células MCF-7 foram cedidas pelo Doutor Paulo Oliveira,

investigador principal no centro de neurociências e biologia celular (CNC) e líder do laboratório MitoXT - *Mitochondrial Toxicology and Experimental Therapeutics*. A linha celular cedida foi criopreservada na passagem 12.

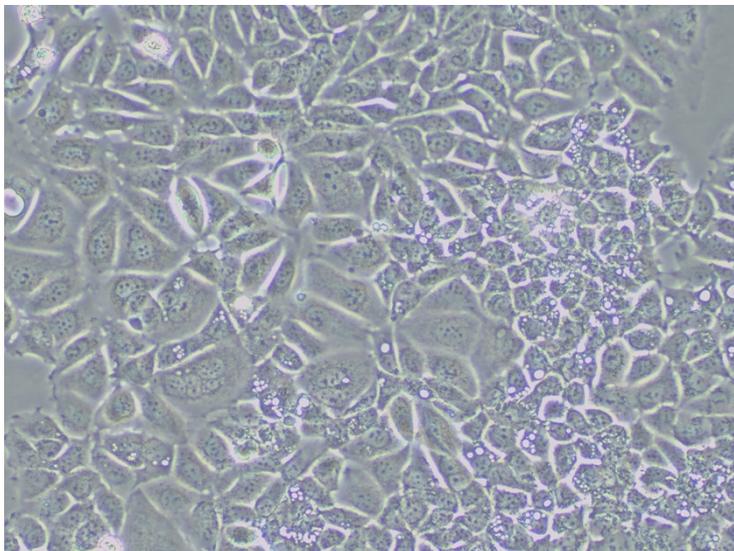


Figura 2.1. | Fotografia representativa (ampliação 100×) de células MCF-7 na passagem 18, crescendo em monocamada, sete dias após a cultura ter sido preparada, com uma densidade inicial de 2000 células/cm².

2.7. Cultura da linha celular MCF-7

2.7.1. Soluções utilizadas na cultura da linha celular MCF-7

- Meio RPMI
 1. RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, R1383-101L) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, em pó, adequado para cultura celular;
 2. NaHCO₃ (Sigma-Aldrich®, S5761) a 2 g L⁻¹;
 3. pH ajustado a 7,1–7,3;
 4. Soro fetal bovino desativado por calor (Vida Technologies™, 10270-106) com uma concentração de 10% (v/v).
- Solução salina com tampão fosfato (PBS), 10×
 1. 1,37 mol dm⁻³ NaCl (99.0-101.5%, VWR Chemicals, 27810.295);
 2. 0,027 mol dm⁻³ KCl (≥ 99%, Sigma-Aldrich®, P5405);
 3. 0,1 mol dm⁻³ Na₂HPO₄ (≥ 99%, Sigma-Aldrich®, S0876);

4. $0,02 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich[®], P5379).

- Tripsina

1. PBS (90 mL) 1 \times ;
2. 20 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ($> 99\%$, Sigma-Aldrich[®], E5134);
3. 10 mL de tripsina de pâncreas de porco a 2,5% (c/v) (Sigma-Aldrich[®], T4549).

2.7.2. Rotina de cultura de células

As células MCF-7 foram cultivadas em frascos com 25 cm^2 (T25) em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas iniciadas com uma densidade de $2000 \text{ células/cm}^2$ foram passadas semanalmente com uma confluência de aproximadamente 80% e mudança de meio ao terceiro ou quarto dia. Todos os procedimentos de passagem de células foram realizados numa câmara de fluxo, em condições assépticas e as células foram mantidas numa incubadora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e numa atmosfera humidificada com 5% (v/v) de CO_2 /95% (v/v) de ar.

A passagem de células iniciou-se com a remoção do meio antigo e com a lavagem da monocamada duas vezes com 2 mL de PBS. Após este processo foi adicionado 1 mL de tripsina ao T25, que atuou durante 30 segundos (Figura 2.3). De seguida, aspirou-se a tripsina e incubou-se até se verificar uma dispersão evidente. Após este procedimento, adicionou-se 5 mL de meio pré-aquecido, centrifugou-se a suspensão (300 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos), verteu-se o meio e ressuspendeu-se o sedimento em meio sem soro. Por fim, retirou-se uma amostra de $50 \text{ }\mu\text{L}$ para um eppdorf para contagem (Figura 2.2.).

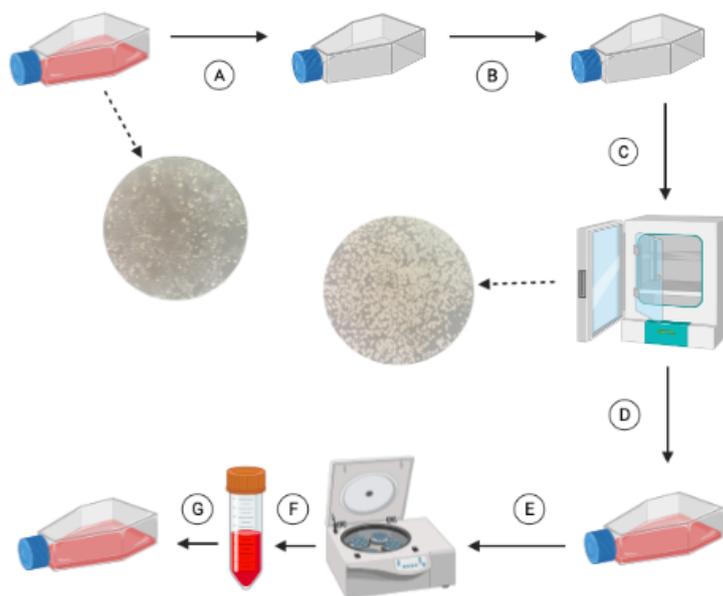


Figura 2.2. | Representação esquemática dos principais passos para subcultura das células MCF-7. O meio foi removido (A) e as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS (B). Após a tripsinização (C), as células foram ressuspensas em 5 mL de meio (D) e centrifugadas (E). O sedimento de células foi ressuspensado em meio sem soro (F). Por último, após a contagem das células, foi transferido um volume apropriado de suspensão para um novo frasco (G).

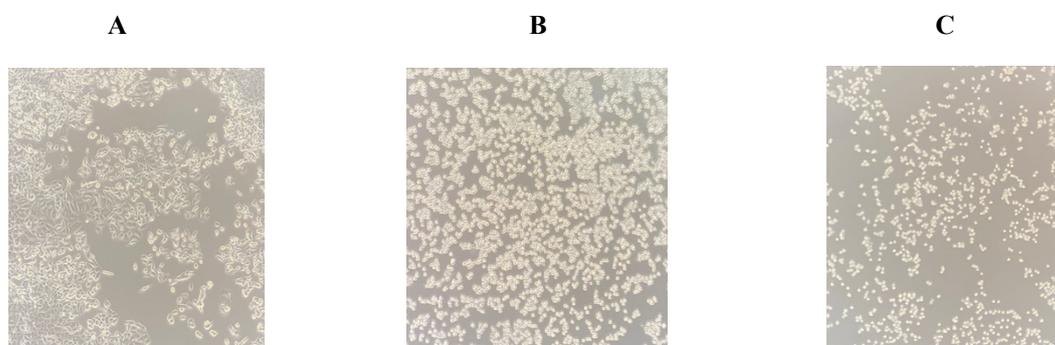


Figura 2.3. | Efeitos da tripsina nas células MCF-7 em cultura. Imagens representativas com ampliação 10× das células MCF-7 na passagem 19: (A) imediatamente após a adição de tripsina, (B) 1 minuto após a adição de tripsina e (C) dois minutos após a adição de tripsina.

2.7.3. Contagem de células

A contagem de células (Figura 2.4) foi feita utilizando o corante azul tripano, um microscópio invertido e um hemocítmetro. Este método foi utilizado na passagem de células, na preparação de culturas para experiências e na determinação de tempos de duplicação. O princípio da coloração com azul tripano é utilizado para distinguir as

células mortas e vivas na suspensão. As células mortas adquirem a cor azul devido à incapacidade de excluir o corante azul tripano, justificada pela membrana plasmática danificada, distinguindo-se facilmente das células vivas que tem uma cor brilhante vistas ao microscópio (92). Para a contagem de células, retirou-se uma amostra de suspensão (50 µL) para um pequeno tubo e adicionou-se azul tripano (50 µL). Após ressuspender, preencheu-se cada uma das câmaras do hemocitômetro e procedeu-se à contagem.

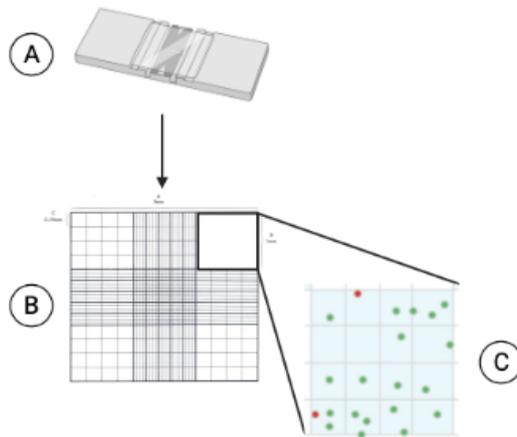


Figura 2.4. | Representação esquemática de um hemocitômetro (A) e de uma das suas câmaras de contagem (B). Para a contagem de células, foi colocada uma lamela sobre o hemocitômetro e foi adicionada uma mistura de suspensão celular e corante azul tripano a cada uma das câmaras de contagem. Em cada câmara de contagem, as células foram contadas de acordo com as regras representadas acima (C), ou seja, as células dentro da grade e sobrepostas com as margens superior e esquerda foram consideradas (círculos verdes), as células sobrepostas com as margens inferior e direita foram excluídas (círculos vermelhos).

Para a cultura celular de rotina e preparação de ensaios foram realizadas pelo menos duas contagens, com intuito de verificar a homogeneidade da suspensão celular. Após as contagens, para o cálculo do número total de células por mililitro na suspensão, multiplicamos o número médio de células dos quadrantes pontuados pelo fator de diluição (2) e pelo volume do poço do hemocitômetro (10^{-4} mL) (equação 2.1).

$$\text{células/ mL} = x \times 2 \times 10^{-4} \quad 2.1$$

x - Número médio de células contadas

2.7.4. Iniciação de uma cultura de células

Para iniciar uma cultura de células MCF-7 foi descongelada uma alíquota e transferida para um frasco de cultura com 75 cm² de área de crescimento (T75), com 15 mL de meio pré-aquecido. Imediatamente após o descongelamento e a transferência da suspensão para um tubo de centrifuga com 5 mL de meio, a suspensão celular foi centrifugada a 300 g durante cinco minutos, para possibilitar a remoção do dimetil sulfóxido (DMSO). O sobrenadante, que continha o DMSO, foi descartado e foram adicionados 5 mL de meio ao tubo de centrifuga com o sedimento. Após ressuspender os 5 mL de suspensão, adicionamo-los ao frasco T75, que continha 10 mL de meio, perfazendo os 15 mL anteriormente referidos. As células foram incubadas a 37 °C e 5% (v/v) de CO₂/95% (v/v) de ar (Figura 2.5).

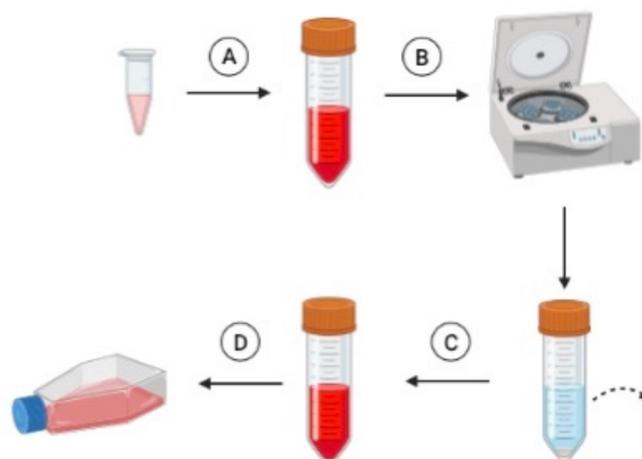


Figura 2.5. | Representação esquemática dos passos principais para iniciação de uma cultura de células MCF-7. Uma alíquota de células criopreservada foi rapidamente descongelada e transferida para um tubo de centrifuga com 5 mL de meio pré-aquecido (A). Após centrifugar a suspensão a 300 g durante cinco minutos (B), o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI (C) e adicionado a um T75 que continha 10 mL de meio (D). A cultura foi incubada a 37 °C e numa atmosfera contendo 5% (v/v) de CO₂/95% (v/v) de ar até estar pronta para a subcultura.

2.7.5. Criopreservação das células

Para a criopreservação de células preparámos dois frascos de cultura de 175 cm² (T175) com 5000 células/cm² e um T75 com 5000 células/cm² da linha celular MCF-7 na passagem 13. Após seis dias na incubadora e dos processos habituais de passagem, adicionamos a um tubo de centrifuga 7 mL de suspensão (70%), 2 mL de soro (20%) e 1 mL de DMSO (10%). As alíquotas foram preparadas com 1 mL da suspensão final,

contendo entre um e quatro milhões de células. As alíquotas foram transferidas para um recipiente de congelação, Mr. Frosty™, onde foram mantidas durante 24 horas a -80°C . Por fim, estas foram armazenadas num contentor com azoto líquido a -196°C (Figura 2.6).

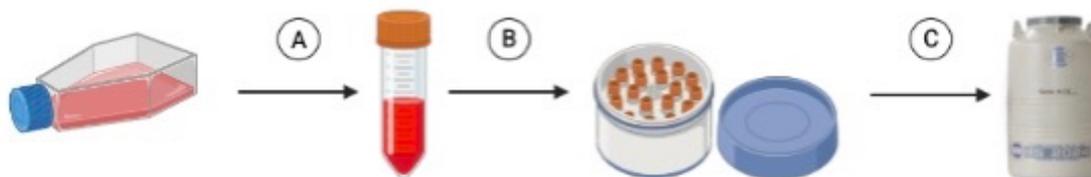


Figura 2.6. | Representação esquemática dos principais passos para criopreservação de células MCF-7. Após os processos habituais de passagem, adicionamos a um tubo de centrifuga 7 mL de suspensão, 2 mL de soro e 1 mL de DMSO (7:2:1) (A). As alíquotas foram preparadas com 1 mL da suspensão final, contendo entre um e quatro milhões de células. As alíquotas foram transferidas para um recipiente de congelação, Mr. Frosty™, onde foram mantidas durante 24 horas a -80°C (B). Por fim, estas foram armazenadas num contentor com azoto líquido a -196°C (C).

2.8. Curva de crescimento

Para realizar uma curva de crescimento preparámos em cada uma das cinco caixas de seis poços três triplicados com uma densidade inicial de 9500 células/ $9,5\text{ cm}^2/\text{mL}$. Após 72 horas, determinámos o número de células nos três poços de uma das caixas, recorrendo ao método da secção 2.7.3, replicando o procedimento até à quinta caixa. A contagem de células inicia-se pela remoção do meio dos poços, seguida da lavagem com PBS $1\times$ (1 mL/poço). Com uma micropipeta, retiramos todos os vestígios de PBS, adicionamos 300 μL de tripsina por poço e colocamos na incubadora. Observamos ao microscópio até estarem redondas. Por fim, sem retirar a tripsina, adicionamos 200 μL de meio, ressuspendemos e tiramos 50 μL para um eppendorf para contagem, descrita na secção 2.7.3.

2.9. Ensaio enzimático colorimétrico para quantificação de glicose

O objetivo da realização do ensaio enzimático colorimétrico foi a quantificação de glicose nos soros condicionados pelo exercício das mulheres na pré e pós-menopausa. Neste ensaio, a glicose presente na solução é oxidada pela glicose-oxidase (GOD), na

presença de oxigénio atmosférico, originando gluconolactona (que espontaneamente se converte a ácido glicónico) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Na presença de 4-animophenazona (4-AAP) e fenol, a oxidação de H₂O₂ pela enzima peroxidase (POD) resulta na formação de um composto de cor avermelhada, que pode ser quantificado espectrofotometricamente a 510 nm. A quantidade de composto de cor avermelhada que é formado é proporcional à quantidade de glicose presente na solução.

O ensaio foi preparado de acordo com as condições apresentadas na Tabela 2.6. As suspensões foram ressuspendidas e deixadas a reagir durante cinco minutos a 37°C. A absorvância foi lida a 510 nm.

Tabela 2.6. | Representação da curva padrão usada para quantificar a glicose presente nos soros condicionados pelo exercício físico, utilizando o kit de glicose. O tubo 5 representa de forma esquemática a preparação das soluções utilizando o soro humano, sendo, portanto, referente a todos os soros utilizados no trabalho experimental.

Tubo	Condições	Tampão fosfato suplementado (µL)	Glicose (100 mg/dl) (µL)	Soros condicionados pelo exercício
1	Branco	1000	-	-
2	Glicose (1 mg/dl)	990	10	-
3	Glicose (2 mg/dl)	980	20	-
4	Glicose (4 mg/dl)	960	40	-
5	Amostra	990	-	10

2.10. Ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB)

Este ensaio consiste na capacidade do SRB se ligar a componentes proteicos das células previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA). O SRB é um corante aminoxanteno rosa brilhante com dois grupos sulfúricos que se ligam a resíduos de aminoácidos básicos em condições ligeiramente ácidas e se dissociam em condições básicas. A quantidade de corante extraída das células coradas, através da adição da solução tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), é diretamente proporcional à massa celular (93).

As culturas de células foram preparadas em placas de 96 poços. Após um período de incubação (24, 48 ou 72 horas), as monacamadas celulares foram fixadas com TCA 10% (v/v) durante uma hora no frigorífico. Após a remoção do excesso de TCA por lavagem repetida com água, é adicionado o SRB. Depois de um período de espera de 30 minutos, cada poço é lavado quatro vezes com ácido acético a 1% (vol/vol). Por último,

é adicionada uma solução de TRIS 10 mM e medida a absorvância a 550 nm (93). A experiência foi repetida em três momentos independentes.

2.11. Ensaio de lactato

Este ensaio enzimático quantifica a atividade da lactato desidrogenase (LDH) presente no meio de cultura do ensaio SRB (secção 2.10), após um período de incubação de 72 horas. O aumento da concentração de lactato é um indicador do aumento das taxas de fermentação do ácido láctico (94). A principal reação química que ocorre no ensaio enzimático de lactato é a conversão de lactato em piruvato, catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH). A LDH tem concentrações elevadas em determinadas condições patológicas, como é o caso do cancro.

Antes da fixação e coloração das células (ensaio SRB), o meio de cultura foi removido e foram adicionados 100 µL de meio novo suplementado com 10% de soro humano. Após um período de incubação de três horas, foram recolhidos 6 µL de amostras do meio e adicionados a 200 µL de solução. A solução foi preparada com seis mL de tampão R1a e seis mL do reagente enzimático R1b presentes no kit comercial L-Lactato. O R1a foi preparado com seis mL de água ultrapura. Por último, a placa foi mantida sob agitação durante 5 a 10 minutos e a absorvância foi lida a 550 nm. A experiência foi repetida em três momentos independentes.

A curva padrão (A_{550} vs concentração de lactato) utiliza cinco soluções aquosas de L-lactato padrão com diferentes concentrações (Tabela 2.7). A concentração de lactato em cada amostra foi calculada através da equação da reta da curva-padrão.

Tabela 2.7. Representação esquemática da curva padrão usada para quantificar o L-Lactato, utilizando o kit randox L-Lactato.

Amostra 1	0 µL lac	6 µL de água pura	0 mM
Amostra 2	1,5 µL lac	4,5 µL de água pura	1,095 mM
Amostra 3	3 µL lac	3 µL água pura	2,190 mM
Amostra 4	4,5 µL lac	1,5 µL de água pura	3,285 mM
Amostra 5	6 µL lac	0 µL de água pura	4,380 mM

2.12. Ensaio de citotoxicidade por SRB

A cisplatina é um agente químico eficaz e bastante utilizado no tratamento do carcinoma da mama, bexiga, pulmão e ovário (95). A literatura determinou que os efeitos citotóxicos da cisplatina estão dependentes da sua capacidade de ligação ao ADN

danificado das células cancerígenas. Esta ligação ativa o mecanismo de reparação do ADN e induz a apoptose celular (96).

A viabilidade da linha celular MCF-7 foi quantificada através da massa proteica, ensaio SRB descrito na secção 2.10. As culturas de células foram preparadas em placas de 96 poços com uma densidade de 5000 cells/cm² e incubadas por um período de 24 horas. Após este período foram adicionados 7,14 µL de cisplatina a cada poço, com uma concentração de 0,4 mM. A placa de cultura foi mantida durante um período de 24 horas na incubadora. A absorvância foi medida a 550 nm.

A concentração de cisplatina a utilizar foi determinada através do cálculo da citotoxicidade celular (cc50) utilizando o programa PRISMA. O cc50 foi determinado a partir da determinação da absorvância para diferentes concentrações de cisplatina (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Representação esquemática das concentrações de cisplatina utilizadas na curva de citotoxicidade para a determinação do cc50.

Cisplatina no meio	
(mM)	(%)
0,0000	0 (Salina)
0,0003	0,0975
0,0006	0,195
0,0013	0,391
0,0026	0,781
0,0052	1,563
0,0104	3,125
0,0208	6,250
0,0417	12,5
0,0833	25
0,1666	50
0,3333	100

2.13. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados experimentais obtidos utilizamos o software SPSS 28. As diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes momentos (M1 e M2) foram testadas através do teste de Wilcoxon. As diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres na pré e pós-menopausa nos momentos 1 e 2 foram testadas através do teste H de Kruskal-Wallis.

As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Para cada parâmetro avaliado realizamos três experiências independentes, com a exceção

dos ensaios enzimático colorimétrico para quantificação de glicose e de citotoxicidade por SRB.

III. Resultados e discussão

3.1. Caracterização da linha celular MCF-7

A linha celular MCF-7, estabelecida a partir de um derrame pleural de uma mulher de 69 anos com um adenocarcinoma da mama (97). As células MCF-7 foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas iniciadas com uma densidade de 2000 células/cm² foram passadas após sete dias de incubação com mudança de meio ao terceiro ou quarto dia, tal como referido na secção 2.7.2. Para determinar o tempo de duplicação da linha celular traçámos uma curva de crescimento, tal como descrito na secção 2.8. Esta curva de crescimento está representada na Figura 3.1.a). O tempo de duplicação (Figura 3.2) foi calculado através da divisão do $\log(2)$ pelo declive da reta (0,0125) do gráfico representativo do log do número médio de células de culturas triplicadas em função do tempo de cultura em horas, referente à curva de crescimento representada na Figura 3.1. O valor encontrado para a variável tempo de duplicação foi 24,1 horas.

O tempo de duplicação de uma linha celular pode variar de acordo com as condições de cultivo, tais como as condições de incubação, a densidade celular inicial, o tipo de meio e a concentração de nutrientes, entre tantos outros fatores inerentes à cultura de células. Apesar disto, a literatura corrobora os resultados obtidos afirmando que o tempo médio de duplicação da linha celular MCF-7 são 24 horas (98).

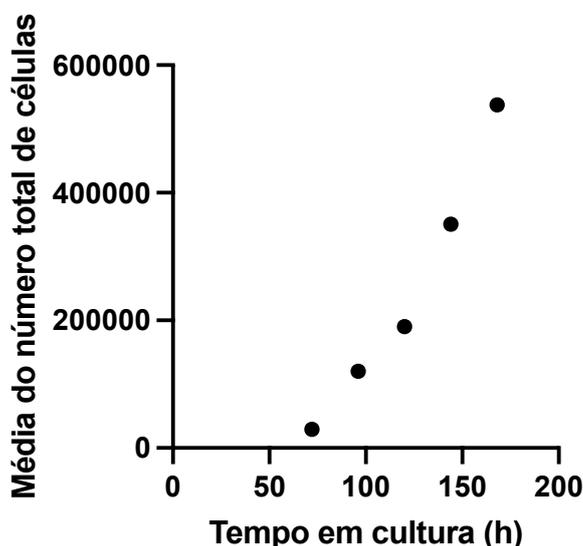


Figura 3.1. | Curva de crescimento representativa de uma cultura de células MCF-7. A cultura de células foi preparada com uma densidade inicial de 2000 células/cm² e monitorizada diariamente, em termos de número total de células vivas), do terceiro ao sétimo dia após a preparação. O número total de células foi determinado recorrendo ao método do azul de tripano, tal como descrito na secção 2.7.3. Cada ponto do gráfico representa a média do número total de células em três culturas.

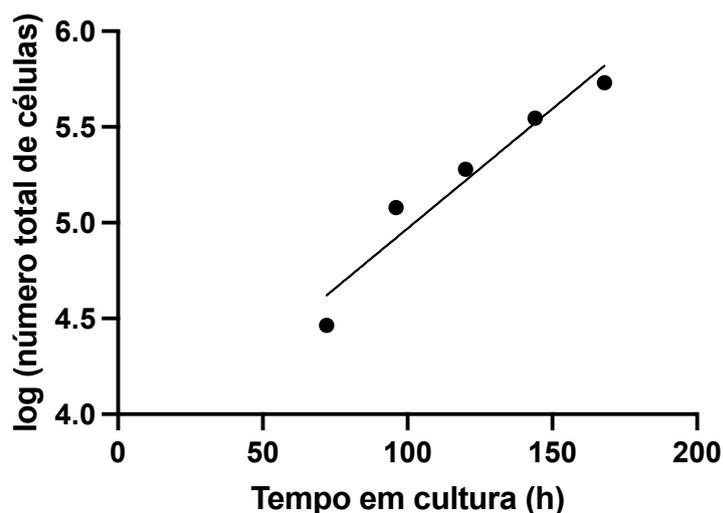


Figura 3.2 | Gráfico representativo do log do número total médio de células de culturas triplicadas em função do tempo de cultura. O tempo de duplicação da linha celular MCF-7 (TD), calculado através da fórmula $TD = \log(2) / \text{declive da reta}$ (0,0125) foi 24,1 horas ($y = 0,0125x + 3,7212$ e $R^2 = 0,9359$).

3.2. Caracterização bioquímica dos soros humanos

Para a caracterização bioquímica dos soros humanos utilizados no trabalho experimental desta dissertação (momentos 1 e 2), quantificámos a glicose e o lactato, recorrendo a ensaios enzimáticos. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 3.1. Na análise dos resultados nos M1 e M2, tal como era expectável, não se verificaram grandes diferenças, considerando que as amostras de sangue foram recolhidas em repouso.

Tabela 3.1. | Concentração de glicose e lactato nos soros humanos utilizados no trabalho experimental desta dissertação.

	M1			M2		
	Glicose		Lactato	Glicose		Lactato
	(mM)	(mg/dL)	(mM)	(mM)	(mg/dL)	(mM)
DFS 002	3,39	61,10	0,345	2,97	53,39	0,350
DFS 005	3,64	65,51	0,119	2,76	49,73	0,118
DFS 009	3,37	60,73	0,231	3,86	69,54	0,258
DFS 011	1,87	33,58	0,088	2,01	36,15	0,128
DFS 023	4,15	74,68	0,264	3,86	69,54	0,298
DFS 033	1,74	31,38	0,054	1,74	31,38	0,100

Abreviaturas: M1, momento 1; M2, momento 2.

3.3. Caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na adesão celular

O efeito de soro condicionado pelo exercício físico na adesão celular foi determinado através do ensaio SRB, descrito na secção 2.10, após um período de incubação de 24 horas. A densidade inicial foi 5000 células/cm². Os resultados apresentados representam a média de absorvância de três experiências independentes. Após 24 horas de incubação observamos uma redução na capacidade de adesão das células MCF-7 de -16,47% (M1: 0,085; M2: 0,071), apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,116$) (Figura 3.3. a).

Para compreender se os efeitos induzidos pelo exercício variam consoante o estado reprodutivo da mulher, analisámos os efeitos de exercício na capacidade de adesão da linha celular MCF-7 em mulheres na pré e pós-menopausa após 24 horas de incubação. Após 24 horas de incubação observamos uma redução na capacidade de adesão das células MCF-7 de -20,93% (M1: 0,086; M2: 0,068) nas mulheres na pré-menopausa e -13,1% na pós-menopausa (M1: 0,084; M2: 0,073). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres na pré e pós-menopausa no M1 ($p = 0,658$) e no M2 ($p = 0,275$) (Figura 3.3. b e 3.3. c).

Um artigo que investigou a relação entre o desenvolvimento do cancro e a adesão celular discutiu que as alterações nas proteínas responsáveis por este processo, como as caderinas e as integrinas, podem conduzir à perda de adesão célula a célula e à capacidade das células cancerígenas proliferarem sem estarem aderentes a uma superfície (99).

Os resultados obtidos mostram que após 24 horas de incubação, a absorvância indicativa da adesão celular foi inferior no M2 (0,071) quando comparada com o M1 (0,085), apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas. Na comparação das mulheres na pré e pós-menopausa verificámos que a adesão celular foi inferior para ambos os grupos no M2, no entanto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

O exercício físico é capaz de diminuir as moléculas de adesão em células do sistema imunitário (100). No entanto, não existem estudos sobre qual o seu efeito a nível das células cancerígenas. Uma capacidade de adesão celular menor poderá beneficiar o controlo do tumor, afetando negativamente o crescimento e capacidade de proliferação das células de cancro da mama.

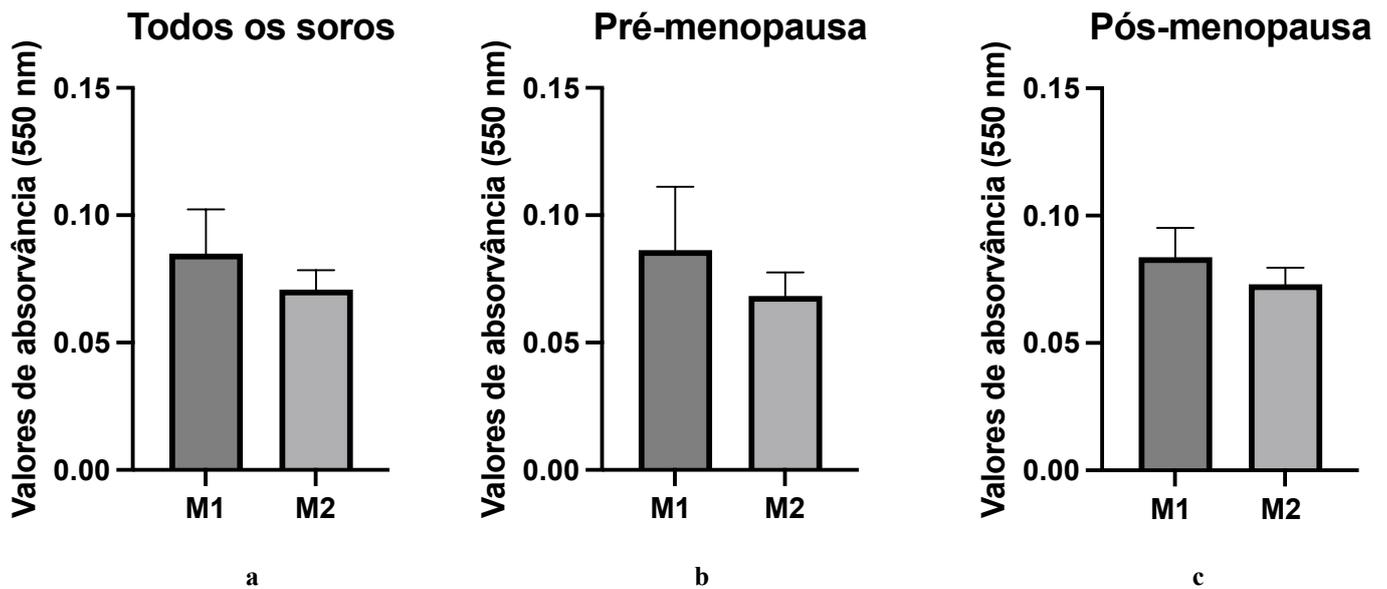


Figura 3.3. | Efeito do soro condicionado pelo exercício na adesão celular da linha celular MCF-7, avaliada através do ensaio clorimétrico de sulforodamina B (SRB). A absorvância foi lida a 550 nm. a) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 de todos os soros, após 24 horas de incubação. b) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pré-menopausa, após 24 horas de incubação. c) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pós-menopausa, após 24 horas de incubação.

3.4. Caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na proliferação celular

O efeito de soro condicionado pelo exercício físico na proliferação celular foi determinado através do ensaio SRB, descrito na secção 2.10, após um período de incubação de 48 e 72 horas. A densidade inicial foi 5000 células/cm². Os resultados apresentados representam a média de absorvância das três experiências independentes. Após 48 horas de incubação observámos uma redução na capacidade proliferativa das células MCF-7 de -16,85% (M1: 0,178; M2: 0,148), verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,028$) (Figura 3.4. a). No ensaio realizado após 72 horas de incubação observamos um aumento de 7,88% na capacidade proliferativa das células MCF-7 (M1: 0,165; M2: 0,178). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,753$) (Figura 3.5. a).

Apesar da variabilidade, os resultados mostram, de uma forma geral, que o programa de exercício físico combinado de 16 semanas conduziu a uma redução média da capacidade proliferativa celular após 48 horas de incubação. Os resultados obtidos

estão em concordância com Baldelli *et al*, que apesar de utilizar amostra e linha celular distintas, demonstrou que o soro condicionado pelo exercício físico conduz a uma redução na capacidade proliferativa nas células de cancro da mama (86). Os resultados obtidos após 72 horas de incubação não são tão esclarecedores, podendo colocar-se a hipótese de que às 72 horas de incubação todas as células já aderiram à placa e proliferaram normalmente.

Para compreender se os efeitos induzidos pelo exercício variam consoante o estado reprodutivo da mulher, analisámos os efeitos de exercício na capacidade proliferativa da linha celular MCF-7 em mulheres na pré e pós-menopausa após 48 e 72 horas de incubação. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres na pré e pós-menopausa no M1 ($p = 0,275$) e no M2 ($p = 0,127$) após 48 horas de incubação. No entanto, as mulheres na pré-menopausa tiveram uma taxa de redução da capacidade proliferativa maior (pré-menopausa: $-17,46\%$; pós-menopausa: $-15,66\%$) (Figura 3.4. b e 3.4. c.) Às 72 horas de incubação também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres na pré e pós-menopausa no M1 ($p = 0,127$) e no M2 ($p = 0,658$). Nas mulheres na pós-menopausa observou-se uma redução na capacidade proliferativa de $-4,21\%$ enquanto que, as mulheres na pré-menopausa registaram um aumento de $20,12\%$ (Figura 3.5. b e 3.5. c).

Um artigo que estudou a relação entre a atividade proliferativa e os recetores de estrogénio no cancro da mama conclui que, de uma forma geral, a quantidade de recetores de estrogénio nos cancros ER+ está inversamente correlacionada com a atividade proliferativa das células (101). Na pós-menopausa os níveis de estrogénio diminuem, provocando uma capacidade proliferativa maior quando comparada com as mulheres na pré-menopausa. Os resultados obtidos sugerem exatamente isso, verificando-se que nos dois momentos em análise (48 e 72 horas) as mulheres na pré-menopausa verificaram uma taxa de redução da capacidade proliferativa superior.

Os rácios 48/24 e 72/48 horas referentes à média dos valores de absorvância dos ensaios independentes realizado às 24, 48 e 72 horas estão representados na Tabela 3.5. O valor encontrado para a variável tempo de duplicação foi 24,1 horas, por isso era esperado que os valores de rácio fossem próximos de 2.

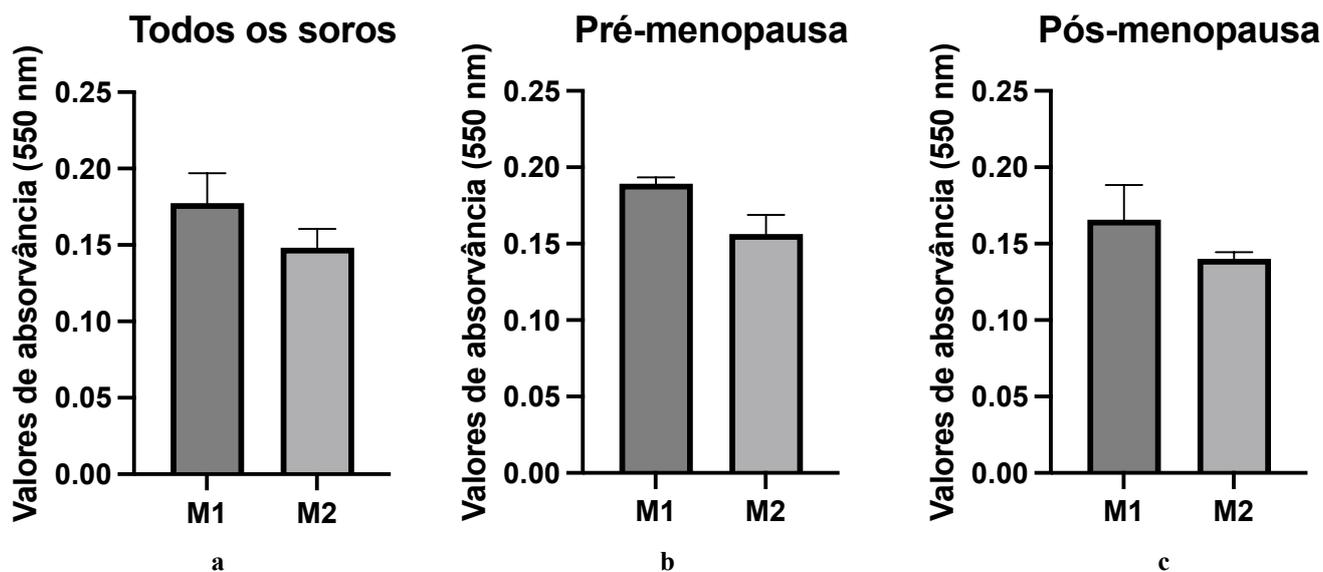


Figura 3.4. | Efeito do soro condicionado pelo exercício na proliferação celular da linha celular MCF-7, avaliada através do ensaio clorimétrico de sulforodamina B (SRB). A absorvância foi lida a 550 nm. a) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 de todos os soros, após 48 horas de incubação. b) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pré-menopausa, após 48 horas de incubação. c) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pós-menopausa, após 48 horas de incubação.

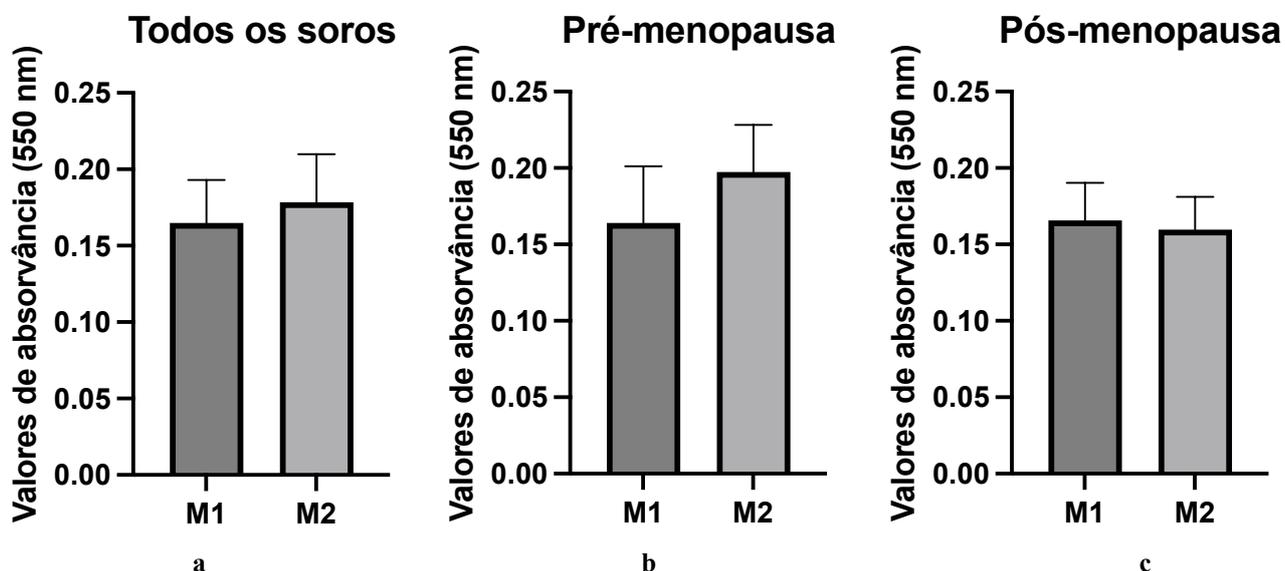


Figura 3.5. | Efeito do soro condicionado pelo exercício na proliferação celular da linha celular MCF-7, avaliada através do ensaio clorimétrico de sulforodamina B (SRB). A absorvância foi lida a 550 nm. a) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 de todos os soros, após 72 horas de incubação. b) Valores da média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pré-menopausa, após 72 horas de incubação. c) Valores da

média da absorvância de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pós-menopausa, após 72 horas de incubação.

Tabela 3.5. | Tabela do rácio 48/24 e 72/48 horas referentes à média dos valores de absorvância dos ensaios independentes realizado às 24, 48 e 72 horas. O valor encontrado para a variável tempo de duplicação foi 24,1 horas por isso era esperado que os valores de rácio fossem próximos de 2.

	RÁCIO 48/24				RÁCIO 72/48			
	M1		M2		M1		M2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
DFS002	1,73	0,19	2,19	0,60	0,69	0,14	1,59	1,12
DFS005	1,50	0,51	1,69	0,66	1,03	0,41	1,59	1,17
DFS009	2,61	0,76	1,73	0,81	1,01	0,18	1,46	0,89
DFS011	2,23	0,70	2,16	0,75	0,84	0,26	0,95	0,16
DFS023	2,53	0,70	2,17	0,35	0,89	0,26	1,13	0,51
DFS033	2,29	0,68	1,65	0,56	1,16	0,48	1,45	1,03

Abreviaturas: DP, desvio padrão.

3.5. Caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na produção de lactato

O efeito de soro condicionado pelo exercício físico na produção de lactato foi determinado através de ensaio enzimático, descrito na secção 2.11, após um período de incubação de 72 horas. A densidade inicial foi 5000 células/cm². Os resultados apresentados representam a média da concentração de lactato de três experiências independentes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 após 72 horas de incubação ($p = 0,917$) (Figura 3.6. a).

A produção de lactato está associada ao esforço físico intenso e conseqüente solicitação das vias anaeróbias. No caso das células cancerígenas verifica-se um fenómeno chamado o efeito Warburg, que se caracteriza pelo metabolismo glicolítico aeróbio acelerado, mesmo na presença de reservas de oxigénio, conduzindo a uma maior produção de lactato (102). O papel do lactato no desenvolvimento e progressão de cancro está associado a um aumento da disseminação de metástases devido à acidificação extracelular, resistência à terapia, inibição da resposta imunitária e pode ainda funcionar como fonte de energia alternativa (103). O exercício físico de alta intensidade tem a capacidade de neutralizar a fermentação tumoral, inibindo a fermentação de ácido láctico, e diminuindo o efeito inibidor que o lactato tem nas células imunitárias citotóxicas (104).

A acumulação de lactato foi inicialmente associada ao efeito Warburg, no entanto, atualmente a literatura descreve que o lactato pode servir como fonte de energia no metabolismo das células cancerígenas. Um artigo que explorou a possibilidade de o

lactato modificar a expressão de oncogenes, genes que codificam fatores de transcrição, a divisão e a proliferação celular na linha celular de cancro da mama MCF-7 apoia a hipótese de que o lactato tem o potencial de atuar como um oncometabolito, regulando os parâmetros acima mencionados (105). O lactato surge como uma molécula preponderante que contribui tanto para o aparecimento como para a progressão tumoral, favorecendo as metástases e a angiogénese tumoral (103).

A avaliação da concentração de lactato em células de cancro da mama quando submetidas a soro condicionado pelo exercício físico é uma investigação piloto, não existindo artigos de comparação. Os resultados obtidos, apesar da variabilidade, demonstram que a produção de lactato foi superior no M2 (0,400 mM) quando compara com o M1 (0,386 mM), não se verificando diferenças estatisticamente significativas.

Para compreender se os efeitos induzidos pelo exercício variam consoante o estado reprodutivo da mulher, analisámos os efeitos de exercício na produção de lactato da linha celular MCF-7 em mulheres na pré e pós-menopausa após 72 horas de incubação. Às 72 horas de incubação não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres na pré e pós-menopausa no M1 ($p = 0,513$) e no M2 ($p = 0,127$) (Figura 3.6. b e 3.6. c).

Os resultados obtidos nos diferentes momentos não verificam grandes diferenças, justificando-se pela recolha do soro em repouso, estando em análise as alterações crónicas provocadas pelo exercício e não os efeitos agudos. No entanto, a concentração de lactato ligeiramente mais elevada no M2 pode ser explicada pela maior massa proteica encontrada no SRB às 72 horas, ao contrário do que tinha acontecido após 48 horas de incubação onde a massa proteica era inferior no M2.

Os resultados apresentados demonstram alguma variação e inconstância e, por isso, são necessárias outras experiências e investigações para confirmar os dados obtidos.

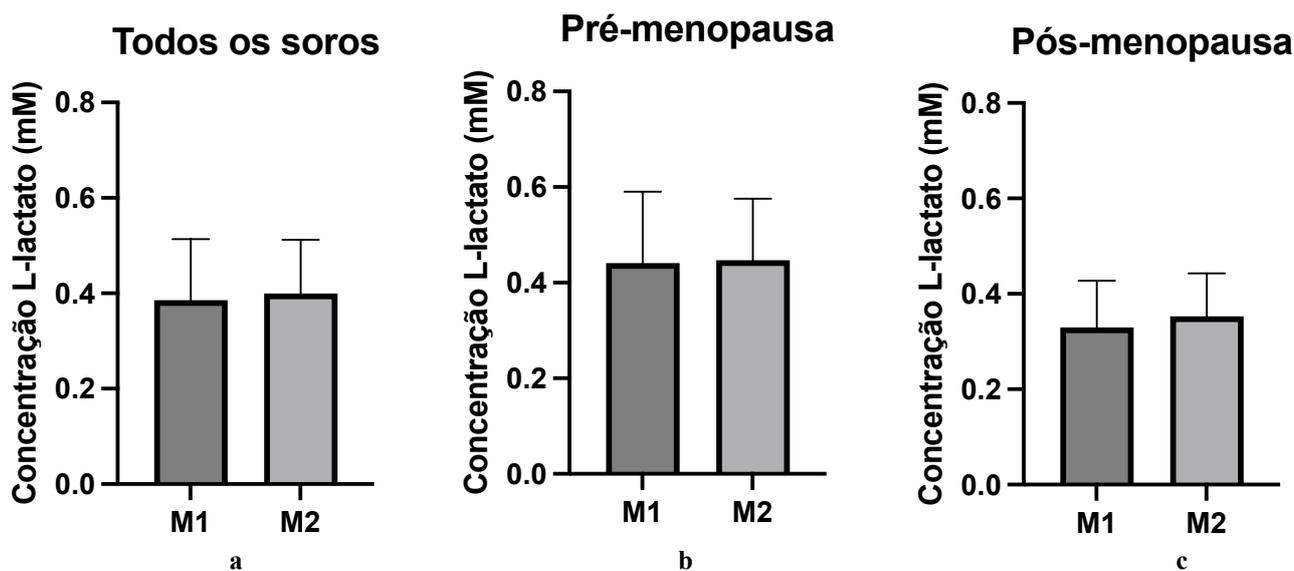


Figura 3.6. | Efeito do soro condicionado pelo exercício na produção de lactato da linha celular MCF-7, avaliada através de ensaio enzimático. A absorvância foi lida a 550 nm. a) Valores da média da concentração de L-lactato de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 de todos os soros, após 72 horas de incubação. b) Valores da média da concentração de L-lactato de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pré-menopausa, após 72 horas de incubação. c) Valores da média da concentração de L-lactato de três experiências independentes nos momentos 1 e 2 dos soros das mulheres na pós-menopausa, após 72 horas de incubação.

3.6. Impacto de soros condicionados pelo exercício físico na citotoxicidade da cisplatina

A concentração de cisplatina a utilizar foi determinada através de uma curva de citotoxicidade com diferentes concentrações de cisplatina e posterior cálculo do cc50 (Figura 3.8). Devido à escassez de soro humano da amostra, utilizamos soro fetal bovino na determinação do cc50. Apesar das diferenças consideramos que o valor encontrado será um valor aproximado daquele que seria o ideal para o soro humano.

O valor de cc50 obtido foi 5,869 mM, com um intervalo de confiança de 95% de 2,730 a 11,92 e um R^2 de 0,564 (Figura 3.7). No ensaio realizado após 24 horas de incubação foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o M1 e o M2 ($p = 0,028$). Os resultados obtidos mostram que em todas as mulheres incluídas na amostra a adesão celular foi superior no M2 quando comparadas com o M1, com uma média de absorvância a 550 nm de 0,176 no M1 e 0,190 no M2.

Um estudo analisou os genes que respondem ao tratamento com cisplatina na linha celular MCF-7 conclui que a transcrição, a ubiquitinação, a dinâmica do citoesqueleto, o ciclo celular, a proliferação celular e a apoptose são afetadas pela cisplatina (106).

Na literatura não é possível encontrar artigos que relacionem o exercício físico e a adesão das células de cancro da mama. O ensaio pretendeu verificar se existem diferenças na citotoxicidade da cisplatina. Os resultados obtidos mostram que o exercício físico conjugado com a cisplatina aumentou a capacidade de adesão celular das células MCF-7 (Figura 3.9). A cisplatina deveria ser citotóxica para as células cancerígenas, diminuindo a sua capacidade proliferativa e de adesão.

Na análise dos resultados obtidos verificamos que o exercício físico atuou como protetor aos efeitos da cisplatina. Os efeitos da cisplatina e do exercício físico na sinalização por mTOR são semelhantes (107), no entanto, os soros foram colhidos em repouso, estando em análise alterações crónicas provocadas pelo exercício físico. O exercício físico crónico não parece potenciar os efeitos da cisplatina.

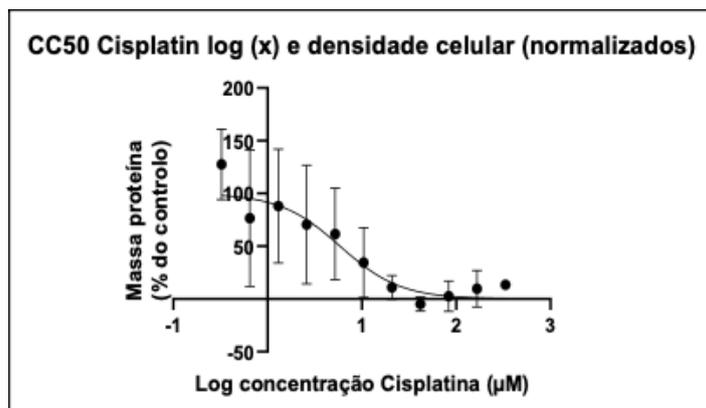


Figura 3.7. Gráfico representativo da massa proteica (% do controlo) em função do log de concentração de cisplatina em µM. Os resultados apresentados representam a média de absorvância de três experiências independentes de curva de citotoxicidade com soro fetal bovino. A absorvância foi lida a 550 nm.

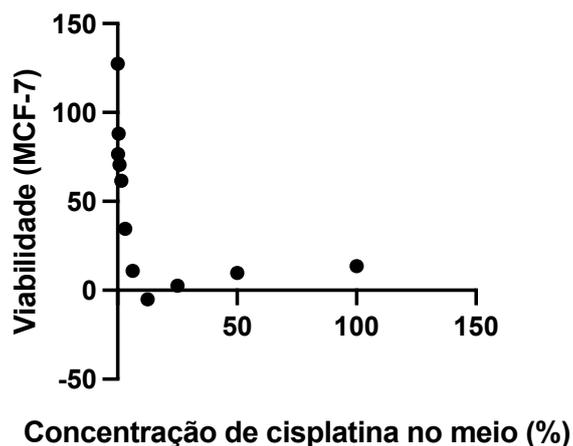


Figura 3.8. | Gráfico representativo da viabilidade da linha celular MCF-7 em função da concentração de cisplatina no meio (%). Os resultados apresentados representam valores médios de três experiências independentes de curva de citotoxicidade com soro fetal bovino. A absorvância foi lida a 550 nm.

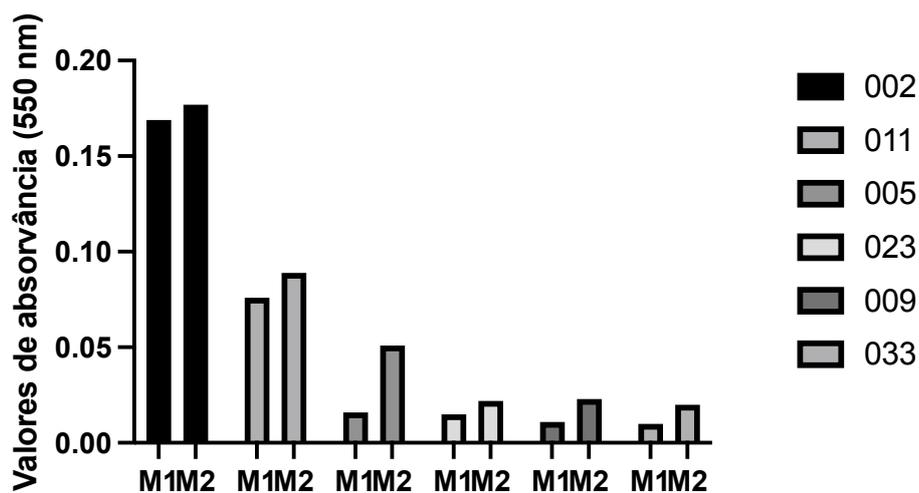


Figura 3.9. | Viabilidade da linha celular MCF-7 em função dos soros das mulheres incluídas na amostra. Os resultados apresentados representam valores de absorvância obtidos numa única experiência. A concentração de cisplatina utilizada no meio foi 0,04 mM. A absorvância foi lida a 550 nm.

IV. Conclusão e perspectivas futuras

4. Conclusão e perspectivas futuras

O principal objetivo deste estudo foi a caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico combinado na adesão e proliferação de células de cancro da mama, em mulheres na pré e pós-menopausa. A investigação estudou ainda os efeitos de soro condicionado pelo exercício na produção de lactato e o impacto na citotoxicidade da cisplatina.

A associação entre o exercício físico e um risco reduzido de desenvolver cancro tem vindo a ser amplamente estudada, tendo sido encontradas algumas evidências (36). Um estudo afirmou que níveis elevados de exercício físico reduzem o risco de desenvolver 13 tipos de cancro (9). O exercício físico a longo prazo melhora o nível de aptidão física, reduz a percentagem de massa gorda, aumenta a percentagem de massa magra, diminui as concentrações basais de hormonas sexuais circulatórias, hormonas metabólicas e fatores inflamatórios e diminui ainda os fatores de risco conhecidos do carcinoma da mama (10).

O exercício físico é capaz de diminuir as moléculas de adesão em células do sistema imunitário (100). No entanto não existem estudos sobre qual o seu efeito a nível das células cancerígenas. Uma capacidade de adesão celular menor poderá beneficiar o controlo do tumor, afetando negativamente o crescimento e capacidade de proliferação das células de cancro da mama. Os resultados obtidos indicam uma adesão celular inferior no M2. Na comparação das mulheres na pré e pós-menopausa verificámos também que a adesão celular foi inferior para ambos os grupos no M2 o que poderá levar a um crescimento mais lento da linha celular.

Na proliferação celular, os resultados obtidos mostram que o soro condicionado pelo exercício físico, de uma forma geral, conduziu a uma redução média da capacidade proliferativa celular após 48 horas de incubação. Os resultados obtidos após 72 horas de incubação não são tão esclarecedores, podendo colocar-se a hipótese de que às 72 horas de incubação todas as células já aderiram à placa e proliferaram normalmente.

Os resultados obtidos na caracterização dos efeitos de soro condicionado pelo exercício físico na produção de lactato não demonstram grandes diferenças, justificando-se pela recolha do soro em repouso, estando em análise as alterações crónicas provocadas pelo exercício e não os efeitos agudos.

O exercício físico conjugado com a cisplatina aumentou a capacidade de adesão celular das células MCF-7. Na análise dos resultados verificámos que o exercício físico atuou como protetor aos efeitos da cisplatina. Os efeitos da cisplatina e do exercício físico

na sinalização por mTOR são semelhantes (107), no entanto, os soros foram colhidos em repouso, estando em análise alterações crónicas provocadas pelo exercício. O exercício físico crónico não parece potenciar os efeitos da cisplatina.

O estudo desenvolvido na presente dissertação apresenta uma abordagem experimental útil para a quantificação dos efeitos provocados pelo exercício físico prolongado na biologia de células cancerígenas. Estudos futuros deverão repetir os ensaios propostos nesta dissertação utilizando uma maior amostra para que se clarifiquem os efeitos do exercício físico combinado na adesão e proliferação de células de cancro da mama, em mulheres na pré e pós-menopausa.

Em conclusão, os resultados obtidos parecem apontar para benefícios do exercício físico prolongado na redução da viabilidade das células de cancro da mama com a consequente redução no risco de desenvolver cancro da mama. No entanto, são necessários mais estudos para determinar a quantidade e o tipo de exercício físico ideal.

Bibliografia

1. <http://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>, acessido a 6 de junho de 2023.
2. <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html>, acessido a 6 de junho de 2023.
3. <https://www.who.int/health-topics/cancer>, acessido a 4 de maio de 2023.
4. <http://gco.iarc.fr/today/home>, acessido a 5 de maio de 2023.
5. Lortet-Tieulent J, Georges D, Bray F, Vaccarella S. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. *Int J Cancer*. dezembro de 2020;147(11):3029–36.
6. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. janeiro de 2023;73(1):17–48.
7. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*. 28 de agosto de 2018;9(1):3490.
8. Hojman P, Gehl J, Christensen JF, Pedersen BK. Molecular mechanisms linking exercise to cancer prevention and treatment. *Cell Metab*. janeiro de 2018;27(1):10–21.
9. Moore SC, Lee IM, Weiderpass E, Campbell PT, Sampson JN, Kitahara CM, et al. Association of leisure-time physical activity with risk of 26 types of cancer in 1.44 million adults. *JAMA Intern Med*. 1 de junho de 2016;176(6):816.
10. McTiernan A. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nat Rev Cancer*. março de 2008;8(3):205–11.
11. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol*. 1 de fevereiro de 2022;95(1130):20211033.

12. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat Rev Clin Oncol*. outubro de 2021;18(10):663–72.
13. Gomes IA, Nunes C. Analysis of the breast cancer mortality rate in Portugal over a decade: spatiotemporal clustering analysis. *Acta Médica Port*. 4 de maio de 2020;33(5):305–10.
14. [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?0-1\\$1-PT\\$2-152,153\\$4-2\\$3-29\\$6-45,54\\$5-2008,2010\\$7-3\\$CAgeSpecificRates\\$X0_14-\\$X0_12-\\$X0_13-\\$X0_16-N\\$CTrendsByAge\\$X1_14-\\$X1_12-\\$X1_18-6\\$X1_16-N\\$CTrendsByPeriod\\$X2_14-\\$X2_12-\\$X2_10-ASR_EU_NEW\\$X2_16-N\\$CTrendsByCohort\\$X3_17-ByPeriod\\$X3_16-N](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?0-1$1-PT$2-152,153$4-2$3-29$6-45,54$5-2008,2010$7-3$CAgeSpecificRates$X0_14-$X0_12-$X0_13-$X0_16-N$CTrendsByAge$X1_14-$X1_12-$X1_18-6$X1_16-N$CTrendsByPeriod$X2_14-$X2_12-$X2_10-ASR_EU_NEW$X2_16-N$CTrendsByCohort$X3_17-ByPeriod$X3_16-N), acessado a 4 de maio de 2023.
15. <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/>, acessado a 4 de maio de 2023.
16. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240067134>, acessado a 4 de maio de 2023.
17. Adraskela K, Veisaki E, Koutsilieris M, Philippou A. Physical exercise positively influences breast cancer evolution. *Clin Breast Cancer*. outubro de 2017;17(6):408–17.
18. <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-factores-de-risco/>, acessado a 4 de maio de 2023.
19. Gompel A. Hormones et cancers du sein. *Presse Médicale*. outubro de 2019;48(10):1085–91.
20. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-cancer-signs-and-symptoms.html>, acessado a 4 de maio de 2023.
21. <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-diagnostico/>, acessado a 4 de maio de 2023.
22. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al.

Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 1 de julho de 2011;121(7):2750–67.

23. <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-deteccao/>, acessido a 4 de maio de 2023.

24. <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-metodos-de-tratamento/>, acessido a 6 de maio de 2023.

25. Weltgesundheitsorganisation, Weltgesundheitsorganisation, editores. Research on the menopause: report of a WHO Scientific Group [on Research on the Menopause ; Geneva, 8 - 12 December 1980]. Geneva: World Health Organization; 1981. 120 p. (Technical report series / World Health Organization).

26. WHO Scientific Group on Research on the Menopause in the 1990s, editor. Research on the menopause in the 1990s: report of a WHO Scientific Group. Geneva: World Health Organization; 1996. 107 p. (WHO Technical report series).

27. Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North Am.* maio de 2015;99(3):521–34.

28. Ambikairajah A, Walsh E, Cherbuin N. A review of menopause nomenclature. *Reprod Health.* dezembro de 2022;19(1):29.

29. Soules MR, Rebar R, Woods N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). 2001;76(5).

30. Tin Tin S, Reeves GK, Key TJ. Endogenous hormones and risk of invasive breast cancer in pre- and post-menopausal women: findings from the UK Biobank. *Br J Cancer.* 6 de julho de 2021;125(1):126–34.

31. Rock CL, Thomson C, Gansler T, Gapstur SM, McCullough ML, Patel AV, et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. *CA Cancer J Clin.* julho de 2020;70(4):245–71.

32. Bhardwaj P, Au CC, Benito-Martin A, Ladumor H, Oshchepkova S, Moges R, et al. Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* maio de 2019;189:161–70.
33. Yau C, Fedele V, Roydasgupta R, Fridlyand J, Hubbard A, Gray JW, et al. Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers. *Breast Cancer Res.* outubro de 2007;9(5):R59.
34. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 1974-. 1985;100(2):126–31.
35. Tremblay MS, Aubert S, Barnes JD, Saunders TJ, Carson V, et al. Sedentary behavior research network (SBRN) – terminology consensus project process and outcome. *Int J Behav Nutr Phys Act.* dezembro de 2017;14(1):75.
36. Mctiernan A, Friedenreich CM, Katzmarzyk PT, Powell KE, Macko R, Buchner D, et al. Physical activity in cancer prevention and survival: A systematic review. *Med Sci Sports Exerc.* junho de 2019;51(6):1252–61.
37. Pizot C, Boniol M, Mullie P, Koechlin A, Boniol M, Autier P. Second revised version physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies.
38. Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH, Lauenborg B, Nookaew I, Hansen RH, et al. Voluntary running suppresses tumor growth through epinephrine- and IL-6-dependent NK cell mobilization and redistribution. *Cell Metab.* março de 2016;23(3):554–62.
39. Hojman P, Dethlefsen C, Brandt C, Hansen J, Pedersen L, Pedersen BK. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. *Endocrinol Metab.* 2011;301.
40. Rundqvist H, Augsten M, Strömberg A, Rullman E, Mijwel S, Kharaziha P, et al.

Effect of acute exercise on prostate cancer cell growth. Lobaccaro JMA, editor. PLoS ONE. 5 de julho de 2013;8(7):e67579.

41. Sasso JP, Eves ND, Christensen JF, Koelwyn GJ, Scott J, Jones LW. A framework for prescription in exercise-oncology research: Editorial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. junho de 2015;6(2):115–24.

42. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender: *Sports Med*. 2008;38(5):401–23.

43. Campbell KL, McTiernan A. Exercise and biomarkers for cancer prevention studies. *J Nutr*. janeiro de 2007;137(1):161S-169S.

44. de Boer MC, Wörner EA, Verlaan D, van Leeuwen PAM. The mechanisms and effects of physical activity on breast cancer. *Clin Breast Cancer*. julho de 2017;17(4):272–8.

45. Neuhaus ML, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL, et al. Overweight, obesity, and postmenopausal invasive breast cancer risk: A secondary analysis of the women’s health initiative randomized clinical trials. *JAMA Oncol*. 1 de agosto de 2015;1(5):611.

46. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. 2008;371.

47. Wolf I. Diabetes Mellitus and Breast Cancer.

48. Palmqvist R. Plasma insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. *Gut*. 1 de maio de 2002;50(5):642–6.

49. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like

growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 7 de abril de 1999;91(7):620–5.

50. Haydon AMM. Physical activity, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and survival from colorectal cancer. *Gut.* 1 de maio de 2006;55(5):689–94.

51. Lann D, LeRoith D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* dezembro de 2008;13(4):371–9.

52. Vigneri R, Frasca F, Sciacca L, Vigneri P, Frittitta L. Re: Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 15 de julho de 2009;101(14):1030–1.

53. Kaaks R, Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc Nutr Soc.* fevereiro de 2001;60(1):91–106.

54. Kruk J, Czerniak U. Physical activity and its relation to cancer risk: Updating the evidence. *Asian Pac J Cancer Prev.* 30 de julho de 2013;14(7):3993–4003.

55. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer.* junho de 2007;14(2):189–206.

56. Harris HR, Tworoger SS, Hankinson SE, Rosner BA, Michels KB. Plasma leptin levels and risk of breast cancer in premenopausal women. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 1 de setembro de 2011;4(9):1449–56.

57. Jardé T, Caldefie-Chézet F, Goncalves-Mendes N, Mishellany F, Buechler C, Penault-Llorca F, et al. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocr Relat Cancer.* dezembro de 2009;16(4):1197–210.

58. Kaaks R, Lukanova A. Effects of weight control and physical activity in cancer prevention: role of endogenous hormone metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 24 de janeiro

de 2006;963(1):268–81.

59. Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, et al. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev.* dezembro de 2010;29(4):641–53.

60. Tworoger SS, Eliassen AH, Kelesidis T, Colditz GA, Willett WC, Mantzoros CS, et al. Plasma adiponectin concentrations and risk of incident breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 de abril de 2007;92(4):1510–6.

61. Abbenhardt C, McTiernan A, Alfano CM, Wener MH, Campbell KL, Duggan C, et al. Effects of individual and combined dietary weight loss and exercise interventions in postmenopausal women on adiponectin and leptin levels. *J Intern Med.* agosto de 2013;274(2):163–75.

62. Dieli-Conwright CM, Parmentier JH, Sami N, Lee K, Spicer D, Mack WJ, et al. Adipose tissue inflammation in breast cancer survivors: effects of a 16-week combined aerobic and resistance exercise training intervention. *Breast Cancer Res Treat.* fevereiro de 2018;168(1):147–57.

63. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 1 de junho de 2011;121(6):2094–101.

64. Lee YS, Kim J whan, Osborne O, Oh DY, Sasik R, Schenk S, et al. Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell.* junho de 2014;157(6):1339–52.

65. Folkerd E, Dowsett M. Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *The Breast.* agosto de 2013;22:S38–43.

66. Campbell KL, Foster-Schubert KE, Alfano CM, Wang CC, Wang CY, Duggan CR, et al. Reduced-calorie dietary weight loss, exercise, and sex hormones in postmenopausal women: Randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 1 de julho de 2012;30(19):2314–26.

67. Emaus A, Veierød MB, Furberg AS, Espetvedt S, Friedenreich C, Ellison PT, et al. Physical activity, heart rate, metabolic profile, and estradiol in premenopausal women. *Med Sci Sports Exerc.* junho de 2008;40(6):1022–30.
68. Verkasalo PK, Thomas HV, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Circulating levels of sex hormones and their relation to risk factors for breast cancer: A cross-sectional study in 1092 pre- and postmenopausal women (United Kingdom). *Cancer Causes Control.* 2001;12(1):47–59.
69. Friedenreich CM, Woolcott CG, McTiernan A, Ballard-Barbash R, Brant RF, Stanczyk FZ, et al. Alberta Physical activity and breast cancer prevention trial: sex hormone changes in a year-long exercise intervention among postmenopausal women. *J Clin Oncol.* 20 de março de 2010;28(9):1458–66.
70. McTiernan A, Tworoger SS, Ulrich CM, Yasui Y, Irwin ML, Rajan KB, et al. Effect of exercise on serum estrogens in postmenopausal women: A 12-month randomized clinical trial.
71. Kang DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer: AACN Clin Issues Adv Pract Acute Crit Care. novembro de 2002;13(4):540–9.
72. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive Oxygen Species (ROS)–Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* junho de 2011;711(1–2):167–73.
73. Gupta-Elera G, Garrett AR, Robison RA, O’Neill KL. The role of oxidative stress in prostate cancer: *Eur J Cancer Prev.* março de 2012;21(2):155–62.
74. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med.* 14 de março de 2011;208(3):417–20.
75. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* novembro de 2006;72(11):1493–505.

76. Gomez-Cabrera MC, Martínez A, Santangelo G, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr.* agosto de 2006;96(S1):S31–3.
77. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC Med.* dezembro de 2011;9(1):62.
78. Na HK, Oliyunk S. Effects of physical activity on cancer prevention: Physical activity in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* julho de 2011;1229(1):176–83.
79. Parkin J, Cohen B. Na overview of the immune system. *THE LANCET*, Vol 357, June 2, 2001.
80. Hojman P. Exercise protects from cancer through regulation of immune function and inflammation. *Biochem Soc Trans.* 15 de agosto de 2017;45(4):905–11.
81. Wennerberg E, Lhuillier C, Rybstein MD, Dannenberg K, Rudqvist NP, Koelwyn GJ, et al. Exercise reduces immune suppression and breast cancer progression in a preclinical model. *Oncotarget.* 28 de janeiro de 2020;11(4):452–61.
82. Montaña-Rojas LS, Romero-Pérez EM, Medina-Pérez C, Reguera-García MM, de Paz JA. Resistance training in breast cancer survivors: A systematic review of exercise programs. *Int J Environ Res Public Health.* 7 de setembro de 2020;17(18):6511.
83. Scharhag-Rosenberger F, Kuehl R, Klassen O, Schommer K, Schmidt ME, Ulrich CM, et al. Exercise training intensity prescription in breast cancer survivors: validity of current practice and specific recommendations. *J Cancer Surviv.* dezembro de 2015;9(4):612–9.
84. Lipsett A, Barrett S, Haruna F, Mustian K, O'Donovan A. The impact of exercise during adjuvant radiotherapy for breast cancer on fatigue and quality of life: A systematic review and meta-analysis. *The Breast.* abril de 2017;32:144–55.

85. Misiąg W, Piszczyk A, Szymańska-Chabowska A, Chabowski M. Physical activity and cancer care—A review. *Cancers*. 27 de agosto de 2022;14(17):4154.
86. Baldelli G, De Santi M, Gervasi M, Annibalini G, Sisti D, Højman P, et al. The effects of human sera conditioned by high-intensity exercise sessions and training on the tumorigenic potential of cancer cells. *Clin Transl Oncol*. janeiro de 2021;23(1):22–34.
87. De Santi M, Baldelli G, Lucertini F, Natalucci V, Brandi G, Barbieri E. A dataset on the effect of exercise-conditioned human sera in three-dimensional breast cancer cell culture. *Data Brief*. dezembro de 2019;27:104704.
88. Dethlefsen C, Hansen LS, Lillelund C, Andersen C, Gehl J, Christensen JF, et al. Exercise-induced catecholamines activate the hippo tumor suppressor pathway to reduce risks of breast cancer development. *Cancer Res*. 15 de setembro de 2017;77(18):4894–904.
89. Dethlefsen C, Lillelund C, Midtgaard J, Andersen C, Pedersen BK, Christensen JF, et al. Exercise regulates breast cancer cell viability: systemic training adaptations versus acute exercise responses. *Breast Cancer Res Treat*. outubro de 2016;159(3):469–79.
90. Bull FC, Al-Ansari SS, Biddle S, Borodulin K, Buman MP, Cardon G, et al. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med*. dezembro de 2020;54(24):1451–62.
91. Ferreira JP, Duarte-Mendes P, Teixeira AM, Silva FM. Effects of combined training on metabolic profile, lung function, stress and quality of life in sedentary adults: A study protocol for a randomized controlled trial. Abdelbasset WK, editor. *PLOS ONE*. 3 de fevereiro de 2022;17(2):e0263455.
92. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. julho de 2016;2016(7):pdb.prot087155.

93. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* agosto de 2006;1(3):1112–6.
94. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/196/572/mak066bul.pdf>, acessado a 15 de agosto de 2023.
95. Heinemann V. Gemcitabine plus cisplatin for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* maio de 2002;3:S24–9.
96. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers.* 15 de março de 2011;3(1):1351–71.
97. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma 2. *JNCI J Natl Cancer Inst.* novembro de 1973;51(5):1409–16.
98. <https://cls.shop/MCF-7/300273>, acessado a 14 de agosto de 2023.
99. Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem.* fevereiro de 2020;295(8):2495–505.
100. Rosa-Neto JC, Lira FS, Little JP, Landells G, Islam H, Pyne DB, et al. Immunometabolism-fit: How exercise and training can modify T cell and macrophage metabolism in health and disease. 2022;
101. Silvestrini R, Daidone MG, Fronzo GD. Relationship between proliferative activity and estrogen receptors in breast cancer. *Cancer.* agosto de 1979;44(2):665–70.
102. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci.* março de 2016;41(3):211–8.
103. De La Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the regulation of tumor microenvironment and

therapeutic approaches. *Front Oncol.* 1 de novembro de 2019;9:1143.

104. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 1 de maio de 2007;109(9):3812–9.

105. San-Millán I, Julian CG, Matarazzo C, Martinez J, Brooks GA. Is lactate an oncometabolite? Evidence supporting a role for lactate in the regulation of transcriptional activity of cancer-related genes in MCF7 breast cancer cells. *Front Oncol.* 14 de janeiro de 2020;9:1536.

106. Fallahi H, Godini R. System-level responses to cisplatin in pro-apoptotic stages of breast cancer MCF-7 cell line. *Comput Biol Chem.* dezembro de 2019;83:107155.

107. Saber MM, Al-mahallawi AM, Nassar NN, Stork B, Shouman SA. Targeting colorectal cancer cell metabolism through development of cisplatin and metformin nanocubosomes. *BMC Cancer.* dezembro de 2018;18(1):822.