



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Vanessa Paz da Fonseca

EFEITO DO SORO DE IDOSAS CONDICIONADO POR UM PROGRAMA DE
28 SEMANAS DE EXERCÍCIO AQUÁTICO NA TRANSFORMAÇÃO DE
CÉLULAS DE CANCRO DO PULMÃO

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

**Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de
Coimbra**

EFEITO DO SORO DE IDOSAS CONDICIONADO POR UM PROGRAMA DE 28
SEMANAS DE EXERCÍCIO AQUÁTICO NA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE
CANCRO DO PULMÃO

Vanessa Paz da Fonseca

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado de Biocinética, orientada pela Professora Doutora Ana Maria Miranda Botelho Teixeira, coorientada pela Professora Doutora Ana Margarida Urbano e apresentada à Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

“You must be the change you wish to see in the world.”
Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Mãe e Pai, já foram 5 anos desta caminhada que nem sempre foi fácil como só vocês sabem, é um orgulho ser vossa filha e ter crescido e evoluído ao vosso lado, um Obrigada nunca irá chegar para mostrar a gratidão que tenho por vocês.

Às minhas irmãs Érica e Catarina pelo apoio incondicional ao longo desta caminhada. Á Carolina, a minha “pequenita” mais nova, por todo o amor, companheirismo e momentos de partilha.

Aos meus avós paternos e em especial à materna por ainda estarem presentes na conclusão de mais uma etapa.

Ao João, o meu namorado por todos os momentos que me incentivaste a ser mais e melhor e que continuemos sempre juntos nesta caminhada.

Aos meus colegas de curso, Vilela, Nuno, Inês, Carolina, Sabina, Iglésias e Meira pelas memórias que me permitiram criaram em Coimbra.

À Professora Ana Teixeira e Ana Urbano pelos ensinamentos ao longo desta jornada. Ao Carlos um agradecimento especial pela paciência durante estes dois anos!

...OBRIGADA!

Índice

Agradecimentos	v
Índice	vii
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	ix
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	15
1. Introdução.....	17
1.1 História do cancro do pulmão.....	17
1.2 Epidemiologia.....	18
1.3 Classificação.....	20
1.3.1 Caracterização e tipos	21
Cancro do pulmão de não pequenas células- NSCLC	21
Cancro de pequenas células- SCLC.....	22
1.4 Benefícios do exercício para a saúde.....	23
1.5 Exercício físico no cancro	24
1.6 Relação entre idade e risco de cancro.....	27
1.7 Prescrição de exercício físico nos idosos.....	29
2. Materiais e Métodos	33
2.1 Materiais gerais.....	35
2.2 Material biológico.....	37
2.3 Cultura de células A549	38
2.3.1 Meio da cultura.....	38
2.3.2 Soluções.....	39
2.3.3 Iniciação da cultura de células.....	40
2.3.4 Rotina da cultura de células.....	40
2.3.5 Criopreservação celular	42
2.4 Contagem de células através do método de exclusão do azul de tripano	43
2.5 Ensaio de viabilidade celular	45
2.5.1 Quantificação do L-lactato	46
2.5.2. Sulforodamina B.....	48
2.5.3 Ensaio clonogénico.....	49
2.5.4 Migração celular	50
2.6 Desenho do estudo.....	50

2.7 Protocolos de exercício.....	51
2.8 Amostra	53
2.9 Análise estatística	54
3. Resultados.....	55
3.1 Efeito dos programas de exercício físico na transformação celular	57
3.1.1 Ensaio de quantificação de lactato.....	57
3.1.2 Determinação da densidade celular	59
3.1.3 Ensaio clonogénico.....	61
3.1.4 Ensaio ferida	65
4. Discussão	71
5. Conclusão	77
6. Referências	81

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ACSM	American College of Sports Medicine
ACSM/AHA	American College of Sports Medicine/American Heart Association
AerG	Grupo Aeróbio
ATP	Adenosina Trifosfato
ATTC	American Type Culture Collection
CombG	Grupo Combinado
CRP	Proteína C-Reativa
DCs	Células Detriticas
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPOC	Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESSA	Exercise and Sports Science Australia
FBS	Soro Fetal Bovino
GC	Grupo Controle
GI	Grupo de Intervenção
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IntG	Grupo Intervalado
LDH	Lactato Desidrogenase
NK	Natural Killer
NSCLC	Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células
OMS	Organização Mundial de Saúde

PBS	Solução Salina Tamponizada com Fosfato
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCLC	Cancro do Pulmão de Pequenas Células
SRB	Sulforodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

Resumo

Desde o século XIX que o cancro do pulmão tem vindo a alcançar proporções de grande escala, que são alarmantes e de grande preocupação em todo o mundo. O cancro do pulmão é das principais causas de morte no mundo, dos que tem mais impacto no sexo masculino e o segundo com mais relevância no sexo feminino.

Uma vez que, o processo de envelhecimento provoca alterações fisiológicas, não era aconselhável que os pacientes idosos fossem submetidos à quimioterapia e radioterapia, pois estas terapias eram de baixa tolerabilidade e consequentemente agravariam os problemas associados ao envelhecimento. Porém, com o surgimento de novas terapias de grande impacto no cancro do pulmão, proporcionaram aumentos nos níveis de esperança e qualidade de vida dos doentes.

A adoção de estilos de vida saudável como não fumar, não consumir bebidas alcoólicas desregradadamente, complementada com a prática regular de exercício físico está associada a um menor risco de cancro. O objetivo deste estudo foi analisar a proliferação, o potencial clonogénico, a capacidade de migração coletiva e o fenótipo metabólico da linha celular de cancro do pulmão A549 quando exposta a meio de cultura contendo soro de idosos condicionado por programas de treino aquático de 28 semanas.

Metodologia: Para a realização deste estudo foi utilizado a linha celular A549, mantida a uma temperatura de 37 °C e com 5% (v/v) de CO₂/ 95% (v/v) de ar. O soro humano condicionado utilizado foi recolhido em repouso, antes e depois de um programa de exercício físico em meio aquático. Para avaliar a transformação celular utilizámos vários ensaios nomeadamente, o ensaio de quantificação de lactato que teve como objetivo estimar a produção de L-lactato durante três horas nos meios de culturas expostas a diferentes soros condicionados por exercício. O aumento dos níveis de concentração de lactato indica que há um aumento das taxas de fermentação láctica. O ensaio SRB permitiu estimar a densidade celular através da medição do conteúdo proteico, densidade essa que pode, por sua vez ser utilizada para avaliar a proliferação celular. O ensaio clonogénico avaliou a capacidade de uma única célula desenvolver uma colónia, permitindo determinar a sobrevivência celular. Por fim, o ensaio de migração estudou a migração de células cancerígenas *in vitro*.

Resultados: Não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas no efeito do exercício crónico nas células do cancro. Contudo, observou-se uma tendência

para uma maior produção de L-lactato nas culturas expostas a soros obtidos após as intervenções, o que parece indicar uma alteração do fenótipo bioenergético. A tendência em quase todos os grupos foi de um aumento de concentrações de L-lactato do M1 para M2. No ensaio SRB, verificou-se uma tendência para a diminuição dos níveis de densidade celular. No ensaio clonogénico, foi notório uma ligeira diminuição da capacidade de formação de colónias, contudo não houve diferenças estatisticamente significativas. No ensaio de migração, verificou-se um aumento de área de migração do M1 para o M2 no grupo aeróbio, tendo acontecido de forma idêntica no grupo intervalado.

Conclusão: Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as culturas de células A549 expostas a soros colhidos no início ou no final das intervenções com exercício verificaram-se tendências que podem ser clinicamente relevantes nomeadamente uma diminuição na transformação da linha celular cancerígena e na capacidade de formação de colónias.

Palavras-chave: Cancro do Pulmão, Idosas, Exercício Físico, Proliferação celular, Grau de Transformação Celular.

Abstract

Since the 19th century, lung cancer has reached large-scale proportions that are alarming and of great concern around the world. Lung cancer is one of the leading causes of death in the world, with the greatest impact on males and the second greatest impact on females.

Since the ageing process causes physiological changes, it was not advisable for elderly patients to undergo chemotherapy and radiotherapy, as these therapies were poorly tolerated and would consequently aggravate the problems associated with ageing. However, with the emergence of new therapies with a major impact on lung cancer, there have been increases in patients' life expectancy and quality of life.

The adoption of healthy lifestyles such as not smoking, not consuming alcoholic beverages in an unhealthy way, complemented with regular physical exercise is associated with a lower risk of cancer. The aim of this study was to analyze the proliferation, clonogenic potential, collective migration capacity and metabolic phenotype of the A549 lung cancer cell line when exposed to culture medium containing serum from elderly women conditioned by 28-week aquatic training programs.

Methodology: This study used the A549 cell line, maintained at a temperature of 37 °C and with 5% (v/v) CO₂/ 95% (v/v) air. The conditioned human serum used was collected at rest, before and after a physical exercise program in an aquatic environment. To assess cell transformation, we used various tests, including the lactate quantification test, which aimed to estimate the production of L-lactate over three hours in the media of cultures exposed to different serums conditioned by exercise. An increase in lactate concentration levels indicates an increase in lactic fermentation rates. The SRB assay made it possible to estimate cell density by measuring protein content, a density which can in turn be used to assess cell proliferation. The clonogenic assay assessed the ability of a single cell to develop a colony, allowing cell survival to be determined. Finally, the migration assay studied the migration of cancer cells *in vitro*.

Results: No statistically significant differences could be seen in the effect of chronic exercise on cancer cells. However, a trend towards greater L-lactate production was observed in cultures exposed to sera obtained after the interventions, which seems to indicate a change in the bioenergetic phenotype. The trend in almost all groups was for

an increase in L-lactate concentrations from M1 to M2. In the SRB assay, there was a tendency for cell density levels to decrease. In the clonogenic assay, there was a slight decrease in the ability to form colonies, but there were no statistically significant differences. In the migration test, there was an increase in the area of migration from M1 to M2 in the aerobic group, which was identical in the interval group.

Conclusion: Although there were no significant differences between the cultures of A549 cells exposed to sera collected at the beginning or end of the exercise interventions, there were trends that may be clinically relevant, namely a decrease in the transformation of the cancer cell line and in the ability to form colonies.

Keywords: Lung Cancer, Aged, Physical Exercise, Cell proliferation, Degree of Cell Transformation.

1. Introdução

1. Introdução

A neoplasia do cancro do pulmão é um problema de saúde atual, constituindo uma das principais causas de morte por cancro a nível mundial. A sua prevalência tem vindo a aumentar no sexo feminino e a sua incidência atingiu um aumento exponencial nos últimos anos da década de 90, ao contrário do sexo masculino em que a incidência e a prevalência têm vindo a diminuir.

O objetivo deste estudo foi analisar as transformações ocorridas numa linha celular do cancro do pulmão exposta a soro humano condicionado de mulheres idosas submetidas a programas de treino aquático durante 28 semanas. O estudo incidiu sobre a análise dos efeitos de três tipos de programas (aeróbio, combinado, intervalado de baixa a alta intensidade) de exercício na capacidade clonogénica, na capacidade de adesão e na alteração metabólica das células de cancro do pulmão. Este estudo trará novas informações sobre o desenvolvimento das células de cancro do pulmão expostas ao soro de mulheres idosas condicionado por diferentes tipos de exercício.

É possível que mesmo quando feito em idades mais avançadas o exercício possa ter um efeito protetor contra o cancro do pulmão. Na comunidade científica apenas foi identificado um estudo que utilizou cultura de células do cancro do pulmão expostas a soro humano de homens jovens condicionado por programas de exercício físico.

1.1 História do cancro do pulmão

O cancro do pulmão é uma das principais causas de morte relacionadas com o cancro, contudo, as variáveis de incidência e mortalidade variam muito a nível mundial (1). As previsões apontam para que os números de casos de cancro do pulmão aumentem, não só por causa do aumento dos hábitos tabágicos nos países menos desenvolvidos, como também consequência de uma população cada vez mais envelhecida (2).

Aproximadamente 85% dos casos de cancro do pulmão advém do tabagismo (3), fazendo deste um dos principais fatores de risco (3,4), assim como doenças do foro pulmonar, nomeadamente a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), bronquite crónica ou asbestose, histórico familiar alusivos a outros tipos de cancros e ao cancro do pulmão (3). Grande parte dos casos de cancro do pulmão são diagnosticados em doentes

sintomáticos, quando já se encontra num estado bastante avançado o que contribui para uma baixa taxa de sobrevivência.

No caso de Portugal, os Inquéritos Nacionais de Saúde de 2019 referem que 17,0% da população com 15 ou mais anos era fumadora, valores que sofreram um decréscimo quando comparados com 2014. É referido ainda que 1,3 milhões de pessoas (14,2%) fumavam diariamente e 248 mil (2,8%) fumavam ocasionalmente (5).

A quantidade e duração do tabagismo está em grande parte relacionada com o desenvolvimento do cancro do pulmão (6–8), a duração da inalação do tabaco é considerada a ligação mais forte no desenvolvimento do cancro do pulmão (9). As evidências atuais apontam para que um fumador que fume um maço por dia durante 40 anos tenham um risco de desenvolvimento do cancro do pulmão 20 a 50% superior comparado com um não fumador (10). De modo geral, um em cada nove fumadores desenvolve cancro do pulmão (11).

Para além do tabagismo existem outros fatores associados ao risco de cancro do pulmão, nomeadamente: 1–historial familiar onde os fatores genéticos podem afetar o risco de desenvolver cancro do pulmão, independentemente da exposição ao cigarro (12,13); 2–doenças pulmonares como DPOC, bronquite crónica ou enfisema (14–16); 3–efeitos do tabagismo passivo (17,18); 4–exposição prolongada ao radão (19–21); 5–historial médico de tratamento com radioterapia para um linfoma não Hodgkin ou para um cancro da mama (22,23).

O aumento de casos de cancro do pulmão em Portugal e no mundo é uma barreira para o desenvolvimento humano e bem-estar, pelo que é urgente haver uma intervenção imediata, tanto a nível dos comportamentos sociais como no estilo de vida de cada um.

1.2 Epidemiologia

A definição de cancro é explicada pelo processo de crescimento descontrolado, excessivo e indefinido de células que transpuseram os mecanismos centrais de controlo endógeno. Esta doença pode ser agrupada de acordo com os seus órgãos ou tecidos de origem, porém, hoje é possível de organizar através das características moleculares das células cancerígenas (24).

A taxa de incidência e de mortalidade está numa fase de crescimento em todo o mundo, as razões são múltiplas e complexas, podendo ser justificadas pelo envelhecimento e crescimento da população e pelas alterações na distribuição dos fatores de risco de cancro associados ao desenvolvimento económico (25,26).

Nos países desenvolvidos há uma maior incidência de cancro, contudo estão à disposição serviços de saúde de melhor qualidade, que posteriormente têm efeitos na detenção, no diagnóstico e no tratamento do cancro (27).

A Figura 1 representa a distribuição dos casos e das mortes dos dez cancros com maior incidência em todo o mundo. Em ambos os sexos, o cancro do pulmão é o que tem mais impacto (11.6% do total de casos) e a principal causa de morte por cancro (18.4%).

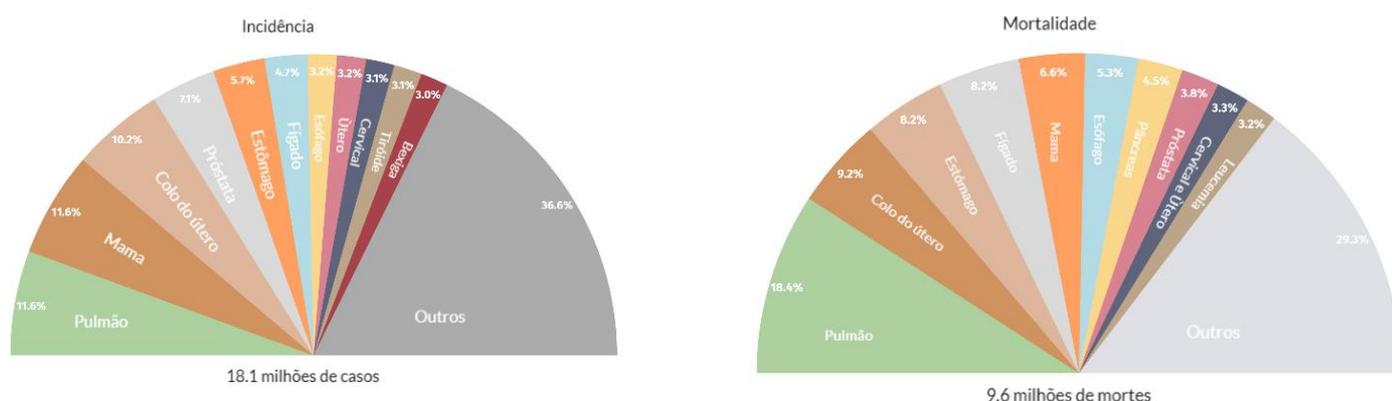


Figura 1 | **Distribuição de casos e mortes para os dez cancros mais comuns em 2018 para ambos os sexos (A).** Em ambos os sexos, o cancro mais incidente e o que provoca um nível maior de mortalidade é o cancro do pulmão com 11.6% e 18.4 % respetivamente (28). A incidência não é igual para todos os grupos etários, verificando-se que há um aumento considerável a partir dos 45–49 anos até aos 75–79 anos, seguido de um decréscimo que pode ser justificado por uma diminuição da população. Adaptado de Sung H et al. (29).

À semelhança do que se passa no resto da Europa, existe um aumento regular da incidência de cancro em Portugal, com uma taxa de aproximadamente 3% a cada ano, aumento que pode em certa medida ser justificado pelo envelhecimento da população. Assim, o cancro pode estar relacionado com a idade (5) . O desenvolvimento do cancro é considerado um processo complexo, que tem sido estudado ao longo de muitos anos (30). O envelhecimento é precedido por processos que são determinados geneticamente, porém

podem ser modificados por fatores externos, nomeadamente, influências ambientais (31–33). Acredita-se que o tabaco acelere o processo de envelhecimento (34). No entanto, os adultos com uma grande taxa de longevidade (descendentes de centenários) têm menos probabilidade de vir a desenvolver cancro (35–37), deste modo, o envelhecimento é um processo natural, não patológico, que pode não conduzir ao aparecimento do cancro (38).

Independentemente da origem, existem características que são comuns à grande parte destas neoplasias, especificamente: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a inibidores de crescimento, escape ao sistema imunitário, imortalização celular, promoção da inflamação pelo tumor, invasão e metastização, indução da angiogénese, instabilidade genómica e mutações, resistência à morte celular e por fim desregulação energética mitocondrial (30).

1.3 Classificação

De acordo com a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas de Saúde Relacionados (ICD-10; C34), o cancro do pulmão é entendido como sendo uma neoplasia maligna de uma parte não especificada do bronco ou pulmão (39). Esta doença surge a partir de células que não são controladas, através do crescimento do epitélio que se alinha na árvore brônquica e que se pode espalhar para um local distante dos pulmões e deste modo produzir tumores metastáticos noutros fragmentos do corpo humano (nomeadamente, cérebro, ossos, fígado, glândulas suprarrenais) (39).

Como referido anteriormente, o cancro do pulmão é o tipo de cancro mais frequente e a principal causa de morte entre todos os tipos de cancro, contudo, houve melhorias substanciais na biologia da doença, na aplicação de biomarcadores preditivos e aperfeiçoamento dos tratamentos que resultaram em progressos para muitos pacientes (40). Também as medidas de saúde pública para a redução das taxas de tabagismo contribuíram para que houvesse uma redução da incidência de cancro do pulmão e uma maior taxa de sobrevivência em países desenvolvidos (41–43).

Estudos recentes afirmam que a incidência de cancro do pulmão está a diminuir no sexo masculino em comparação com o sexo feminino sendo justificado pelo atraso histórico na adoção e cessação do tabaco nas mulheres (43,44).

Esta neoplasia é uma doença heterogénea com características clínico patológicas muito abrangentes (45), podendo ser classificada como NSCLC (cancro do pulmão de não pequenas células) representando cerca de 85% dos diagnósticos para os quais a taxa de sobrevivência a cinco anos é de 15.9 % (46) e SCLC (cancro do pulmão de pequenas células) representando cerca de 15% dos diagnósticos. Estes tipos de cancro só são possíveis de distinguir ao microscópio com base no aspeto das células malignas, esta diferenciação é fundamental para um correto estadiamento, tratamento e prognóstico (45).

1.3.1 Caracterização e tipos

Cancro do pulmão de não pequenas células- NSCLC

O NSCLC é subdivido em vários subtipos, nomeadamente, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, epidermoide ou espinhocelular e por fim carcinoma de células grandes (47,48). O adenocarcinoma é o subtipo mais comum, especialmente entre os não fumadores e tem origem nas pequenas vias aéreas e nos alvéolos, aparecendo muitas vezes associado a locais de cicatrização. Ainda dentro da tipologia dos adenocarcinomas o subtipo mais comum é o carcinoma bronco-alveolar, muito comum no sexo feminino e nos sujeitos não fumadores (47).

Nos últimos anos, observou-se um número crescente de casos da tipologia adenocarcinoma o que pode ser justificado pela mudança dos filtros dos cigarros com baixo teor de alcatrão. Esta redução faz com que a inalação seja mais profunda e deste modo atinga a periferia do pulmão (49).

O NSCLC está presente em oito em cada 10 pessoas com cancro do pulmão e advém de uma acumulação de células danificadas, que tendem a crescer, multiplicar-se e propagar-se de uma forma descontrolada (50). Existem fatores de risco que podem ser evitados, nomeadamente fumar, estar exposto ao fumo passivo ou ao radão, amianto, urânio entre outros materiais radioativos e químicos. Por outro lado, há fatores que não podem ser alterados, como é o caso da poluição atmosférica, hereditariedade e radioterapia previa aos pulmões. Os sintomas são variados e não específicos, sendo que os possíveis incluem tosse persistente com sangue, falta de ar, voz rouca, infeção pulmonar, fadiga e perda de apetite (50).

Cancro de pequenas células- SCLC

Esta tipologia de cancro é classificada como sendo um carcinoma neuroendócrino muito violento, pouco diferenciado e de alto grau, representa cerca de 13% dos carcinomas pulmonares e normalmente é mais comum em fumadores que fumam há mais anos (51).

A SCLC está fortemente relacionada com o tabaco, sendo que a sua prevalência tende a ser igual ao predomínio do tabagismo (52), apenas 2% dos casos de SCLC surgem em indivíduos que nunca fumaram (53). Muitos estudos afirmam haver ligação entre a exposição à poluição atmosférica (54) e ao radão (55) porém os resultados são limitados. Acredita-se que os fatores genéticos têm um papel reduzido à suscetibilidade de desenvolvimento de SCLC (56) .

As características clínicas desta tipologia são diferenciadas, abrangem a localização predominantemente central do tumor primário nas principais vias aéreas e propagação extrapulmonar metastática. Uma vez que, esta tipologia tem um crescimento do tumor rápido, a grande parte dos indivíduos com SCLC são sintomáticos, sendo que a duração dos sintomas é inferior a três meses. Contudo, os sintomas mais comuns incluem tosse, pieira, dispneia, hemoptise, compressão superior da veia cava que resulta consequentemente num edema na parte superior do corpo (57).

Estudos publicados recentemente evidenciaram que os indivíduos do sexo feminino, independentemente da idade, têm mais tendência a desenvolver este tipo de cancro do pulmão do que os do sexo masculino, sendo que as mulheres mais novas apresentam maior tendência do que as mais velhas. Este facto parece indicar que as mulheres que começam a fumar mais cedo parecem estar mais suscetíveis ao desenvolvimento do cancro do pulmão de pequenas células (55,58–61).

1.4 Benefícios do exercício para a saúde

Um estilo de vida ativo é um fator importantíssimo que pode trazer melhorias na saúde física, mental e no bem-estar. Ser ativo traz benefícios que são independentes da idade, do sexo, da raça, da etnia e do nível de aptidão física (64).

Por outro lado, a inatividade física é um dos principais fatores de risco de morte em todo o mundo (65). Moore et al., com uma amostra de 1,44 milhões de participantes, concluiu que existe uma associação entre o nível de atividade física e o risco de desenvolvimento de cancro. Neste estudo verificou-se que o aumento da atividade física está associado à redução do risco de desenvolvimento de cancro de 13 dos 26 tipos de cancro analisados (66).

A maioria das doenças crónicas e parte das perturbações mentais são influenciadas pela atividade física regular, tendo sido comprovado que apenas uma sessão de atividade física moderada teve impacto na redução da pressão arterial, na melhoria da sensibilidade à insulina, na melhoria do sono, na redução de sintomas de ansiedade e melhorias significativas a nível cognitivo (atenção e memória) (67).

Com a prática regular de atividade física há uma melhoria constante da função física, reduzindo a mortalidade, assim como o risco de doença coronária, a hipertensão arterial, os acidentes vasculares cerebrais, a resistência à insulina, diabetes tipo 2, desenvolvimento de certos cancros, depressão, ansiedade, doenças neurodegenerativas e quedas. Além disso, há aumentos dos níveis de aptidão cardiorrespiratória e muscular, do reforço do sistema imunitário, composição corporal, melhoria da saúde óssea, aumento da saúde funcional e melhoria da função cognitiva (68).

A prática de atividade regular ao longo da vida é importante e acarreta inúmeros benefícios, entre eles (67):

- crescimento e desenvolvimento saudável;
- melhoria da saúde óssea e controle de peso em crianças dos três aos treze anos;
- melhoria da aptidão cardiorrespiratória e muscular;
- benefícios para o cérebro, com grande influência na função cognitiva, na redução da ansiedade, da depressão, e do risco de deficiência cognitiva;
- melhoria da qualidade de sono e da qualidade de vida;

- nas grávidas, há uma redução do risco de aumento excessivo de peso, diabetes gestacional e depressão pós-parto;
- nos idosos, há uma redução significativa no risco de lesões, queda e uma melhoria na função física e na mobilidade.

A atividade física é estimada através da aplicação do princípio FITT (F– frequência, I–intensidade, T–tempo e T– tipo). A frequência representa a quantidade de vezes que um sujeito é fisicamente ativo, a intensidade avalia o exercício, o tempo exibe a duração total da atividade, por fim o tipo de atividade pode ser de dois tipos, nomeadamente aeróbia ou anaeróbia (69).

Em 2020, a organização mundial de saúde (OMS) partilhou novas diretrizes com foco na atividade física e no combate ao comportamento sedentário. Estas novas diretrizes aconselham a prática de 150–300 minutos de atividade física moderada ou 75–150 minutos de atividade física vigorosa (70). Para os mais jovens, as diretrizes realçam a importância para uma maior atividade física diária (71).

Uma vez que foi comprovado que a atividade física é um fator decisivo para saúde, existe cada vez mais um esforço político para aumentar os níveis de atividade física. Segundo o plano de ação mundial para a atividade física (GAPPA) 2018–2030 proposto pela OMS, o objetivo passa por ajudar os países a desenvolver ações políticas para promover a atividade física e minorar a inatividade física em 10% até 2025 e 15% até 2030. Este plano realça quatro objetivos estratégicos (sociedades ativas, ambientes ativo, pessoas ativas e sistemas ativos) (72).

1.5 Exercício físico no cancro

As características genéticas do cancro, o estilo de vida e as variáveis ambientais são as influências com mais destaque no desenvolvimento do cancro (73). Além disso problemas de excesso de peso, de obesidade e de inatividade são também fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do cancro (74). Assim, a manutenção de um equilíbrio energético está associado à prevenção primária do cancro, à sobrevivência após o diagnóstico e à não recorrência do cancro (75,76) .

A atividade física pode atuar como um modificador dos efeitos do cancro do pulmão e um potencial fator modificável que tem influência sobre o cancro do pulmão e a sua incidência (77) .

Vários estudos comprovaram a diminuição do risco de cancro do pulmão como mostra a Figura 2, quando comparando sujeitos fisicamente ativos com sujeitos sedentários, e o desfecho em todos eles foi uma diminuição de 20–50% do risco de desenvolvimento do cancro (78–96), sendo que os valores foram de 20–30% para o sexo feminino e 20–50% para o sexo masculino (97).

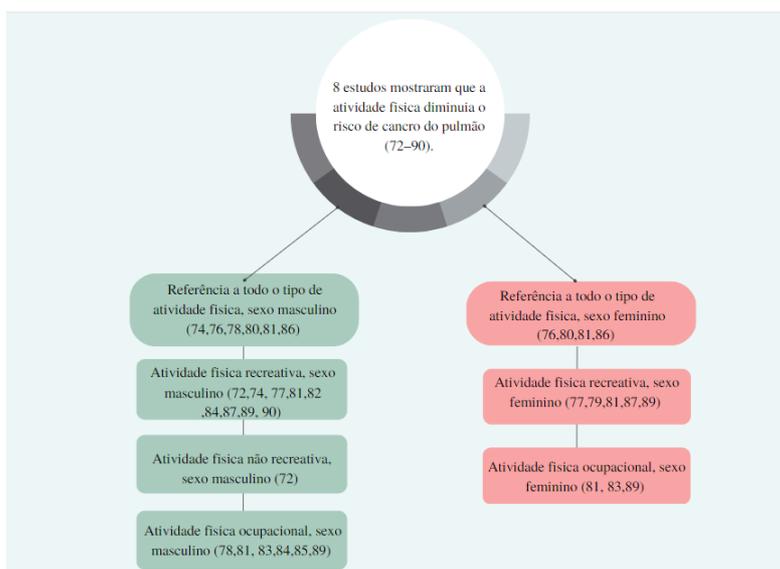


Figura 2| Principais estudos epidemiológicos da atividade física e do cancro do pulmão de acordo com o sexo (97).

A atividade física tem benefícios na função pulmonar, conseguindo melhorar a ventilação pulmonar e perfusão (98), esta melhoria irá provocar uma redução das partículas e dos agentes cancerígenos (99). O tipo, a intensidade e a duração do exercício físico tem a capacidade de moldar a resposta imunitária e inflamatória (100), nomeadamente aumentando o recrutamento de células *natural killer* (NK) para o sangue e melhorando a sua função, protegendo contra a carcinogénese através do reconhecimento e eliminação das células anormais (101) .

O pulmão é um órgão que está em constante exposição à inflamação e a doenças infecciosas, o que consequentemente pode aumentar a suscetibilidade da transformação maligna (102). Os aumentos dos níveis de fatores pro-inflamatórios, nomeadamente a interleucina 6 (IL-6), a proteína C-reativa (CRP) e o fator de necrose tumoral- α (TNF-

α) estão relacionados com o aumento do risco de desenvolver cancro (103). Estudos recentes mostraram que o aumento dos níveis da atividade física (a uma intensidade moderada) diminui os marcadores de inflamação, sobretudo a IL-6, CRP e TNF- α (86).

O vínculo entre atividade física e cancro pode também passar pelo tecido adiposo, uma vez que, um estilo de vida saudável tem um papel decisivo na manutenção fisiológica do tecido adiposo, controlando a deposição de triglicérides, o estado inflamatório, respostas imunes e atividade endócrina (104).

A prática de exercício físico traz também benefícios no papel de apoio à gestão do cancro do pulmão e acarreta melhorias na qualidade de vida dos indivíduos em fase de tratamento, podendo ser destacados os seguintes:

- I. Aumento significativos da energia e da resistência. No caso do cancro do pulmão, os tratamentos causam muita fadiga e diminuição da resistência, sendo que a prática de exercício aeróbio regular como as caminhadas ou o andar de bicicleta, ajuda no aumento da aptidão cardiovascular, nos níveis de energia e no combate da fadiga relacionada com os tratamentos (105);
- II. Melhorias na força muscular e na flexibilidade. Nos tratamentos do cancro do pulmão há relatos de uma fraqueza muscular e de uma diminuição da flexibilidade, sendo que exercícios de força como levantamento de pesos ou até mesmo treino de resistência podem ajudar a manter ou até mesmo aumentar a força muscular e aumentar a flexibilidade, o que permite aumentos de mobilidade (106);
- III. O cancro do pulmão afeta diretamente todo o sistema respiratório provocando complicações respiratórias, porém o exercício físico pode melhorar a função respiratória, uma vez que aumenta a capacidade pulmonar, aumentando também a absorção de oxigénio e deste modo melhorar os níveis respiratórios (107);
- IV. O diagnóstico e o tratamento do cancro do pulmão têm um impacto negativo a nível emocional. Foi comprovado que a prática de exercício físico tem resultados positivos no humor através da produção de hormonas que regulam o humor (endorfinas, serotoninas, dopamina e oxitocinas) e na redução dos sintomas de ansiedade e depressão. Pode também proporcionar uma sensação de controlo e poder sobre a saúde (108).

O tipo, a intensidade e a duração do exercício físico tem a capacidade de moldar a resposta imunitária e inflamatória. A secreção prolongada de citocinas pró-inflamatórias podem levar à transformação de células que eventualmente levem ao desenvolvimento de cancro. O exercício físico pode reduzir muitos marcadores de inflamação.

1.6 Relação entre idade e risco de cancro

A idade é um dos principais fatores de risco do cancro, dado que as taxas de incidência e de mortalidade aumentam com o avançar da idade (109). A maioria dos tumores é diagnosticado em idosos e com um envelhecimento da sociedade é previsível um aumento de diagnósticos (110,111).

O processo de envelhecimento é complexo e envolve múltiplos sistemas, nomeadamente alterações fisiológicas e moleculares que cooperam para a degeneração e declínio funcional de todos os órgãos e sistemas do corpo, que consequentemente contribuem para o aumento da suscetibilidade a várias doenças e ao aumento da mortalidade (112).

Alguns dos mecanismos biológicos que estão presentes na regulação do envelhecimento estão também presentes na patogénese de doenças, como é o caso do cancro (113,114). Mudanças nos fatores ambientais irão permitir alterações nos mecanismos biológicos e deste modo retardar o envelhecimento (31).

É na meia-idade que os fatores de risco (tabagismo, inatividade, má nutrição, consumo excessivo de álcool, infeções crónicas) começam a estar relacionados com o cancro e por esse motivo começam a ter impacto no dia-a-dia dos indivíduos (115,116). A presença de várias condições e doenças crónicas como é o caso da obesidade e diabetes tendem a aumentar com a meia-idade e algumas destas condições tem sido associada ao risco acrescido de cancro assim como à redução da sobrevivência do mesmo (116).

De acordo com Gregori et al. (117) existem fatores que explicam o motivo do cancro ser uma doença do envelhecimento, tendo por base a teoria da história de vida, ou seja, teoria que descreve os diferentes padrões de maturação, crescimento, reprodução e potencial duração de vida. O modelo oncogénico mostra que as alterações na estrutura e função dos tecidos nas idades mais avançadas criam oportunidades para a seleção de novos fenótipos oncogénicos que são adaptativos ao envelhecimento.

O termo “imunossenescência” representa o declínio das funções do sistema imunitário e ocorre com a idade. Os efeitos clínicos da imunossenescência debruçam-se sobre a resposta imunitária menos eficaz, tendo como consequência uma maior vulnerabilidade às infecções respiratórias, às neoplasias incluindo o cancro e às doenças cardiovasculares. Por outro lado, também há uma menor resposta às vacinas (118).

A imunossenescência afeta alguns elementos do sistema imunológico inato, nomeadamente os monócitos, as células NK e as células dendríticas (DCs). Para além do sistema imunológico inato, também o sistema adaptativo é afetado especialmente os linfócitos B e T.

O envelhecimento é um fenómeno multifatorial que acarreta: alterações nas células linfóides e mielóides através de distúrbios da medula óssea, Com o avançar da idade dá-se também uma diminuição das células T por involução do timo e distúrbios na formação, maturação homeostase e migração de linfócitos periféricos (119,120).

Relativamente à imunidade inata nos idosos, sabe-se que existem perturbações funcionais dos neutrófilos, nomeadamente na quimiotaxia, fagocitose e produção de radicais livres acrescentado ainda uma diminuição da produção de citocinas (119). Os macrófagos apresentam uma menor percentagem na medula óssea e conseqüentemente uma menor produção de NO_2 e H_2O_2 e de citocinas derivadas dos macrófagos como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 (119).

Também as células dendríticas, apresentam um ligeiro declínio reduzindo a ativação e proliferação das células T e conseqüentemente prejudicando a ligação entre a imunidade inata e imunidade adquirida (119,121).

As estratégias centradas na promoção de comportamentos saudáveis podem reduzir os valores de incidência de cancro, através de uma otimização do equilíbrio energético, eliminação da exposição ao tabaco e uma diminuição do consumo de álcool (122).

O envelhecimento do sistema imunológico pode estar associado ao desenvolvimento de cancro, uma vez que, o sistema imunológico tem um papel fundamental na detenção e destruição de células cancerígenas. Há medida que se envelhece, este sistema sofre alterações que podem comprometer a sua eficácia.

1.7 Prescrição de exercício físico nos idosos

A prática regular de exercício físico planeada e prescrita por profissionais é um fator positivo na melhoria da qualidade de vida dos idosos, uma vez que melhora os níveis de equilíbrio, previne as quedas, diminui a inflamação crónica de baixo grau e o desenvolvimento de doenças crónicas e degenerativas (123).

De acordo com a literatura, os idosos com taxas mais elevadas de atividade física apresentam níveis baixos de triglicéridos, de perdas ósseas e de gordura corporal e níveis mais altos de colesterol HDL, funcionalidade muscular e maior resposta das células à insulina (124,125).

A prescrição de exercício físico na terceira idade, inclui trabalho de força, de agilidade, de flexibilidade, de resistência aeróbia e de coordenação (126). Segundo as diretrizes da OMS e do ACSM, a população idosa deve praticar duas a três vezes por semana exercícios de força, exercícios de flexibilidade, exercícios neuromotores, com uma duração de pelo menos 150 minutos de exercício aeróbio de intensidade moderada a vigorosa (127) por semana.

De acordo com Quist et al (2012), o exercício físico deve ser moderado para que seja possível obter melhores resultados nos níveis de bem-estar, na esperança de vida e na resistência ao tratamento do cancro (128).

Num estudo defendido por Temel et al (2009) e Quist et al (2012) um programa de exercício físico deve conter diferentes abordagens, nomeadamente, aquecimento, treino muscular, treino aeróbio, finalizando com uma fase de relaxamento.

Num estudo desenvolvido por Zaleski et al. representado na Tabela 1, foram abordadas as recomendações gerais de prescrição para o idoso de acordo com várias associações e instituições, entre elas, a *Centers for Disease Control and Prevention*, *American College of Sports Medicine/American Heart Association*, *Canadian Society of Exercise Physiology National*, *World Health Organization Institutes of Health* e *British Geriatric Society* (129).

Tabela 1| **Recomendações gerais de prescrição do exercício para idosos** de acordo com a ACSM/AHA. Adaptado de Zaleski et al. (129).

F (frequência)	≥ 5 dias/semana (moderado) 3 a 5 dias/semana (moderado–intenso) ≥ 3 dias/ semana (intenso)
I (intensidade)	Moderado a intenso
T (tempo)	≥ 30 minutos/dia (moderado) ≥ 20 minutos/dia (intenso)
T (tipo)	Aeróbio
Adjuvante 1	Treino de força (fortalecimento músculo–esquelético) ≥ 2 dias/semana (não consecutivo) 8 a 10 exercícios ≥ 1 série de 10 a 15 repetições
Adjuvante 2	Flexibilidade ≥ 2 dias/semana, pelo menos 10 minutos/dia
Adjuvante 3	Equilíbrio ≥ 3 dias/semana
V (volume)	≥ 150 minutos/semana (moderado) ≥ 75 minutos/semana (intenso)

Uma vez que a população idosa é heterogênea relativamente ao estado de saúde e funcionalidade, é de esperar que os programas de exercício físico sejam específicos e individualizados, tendo sempre em atenção as comorbilidades ou condições geriátricas que limitem certos exercícios (129,130).

Segundo as recomendações da ACSM, é aconselhado que a população idosa seja avaliada previamente, para que seja possível a identificação de patologias de risco que contraindiquem a prática de exercício físico, nomeadamente problemas como insuficiência cardíaca congestiva descompensada, embolismo recente, hipertensão não controlada, estenose aórtica severa, diabetes mellitus descompensada, entre outros (129).

Para um idoso sedentário, a prescrição inicial passa por incentivar a atividade física do quotidiano (caminhadas), dado que, inicialmente o objetivo é aumentar o tempo

ativo e combater o sedentarismo (130). Posteriormente será acrescentado um programa de exercício estruturado com exercícios aeróbios, treino de resistência/força e exercícios com foco no equilíbrio e flexibilidade (130).

Relativamente à prescrição de exercício para pacientes com cancro, existe pouca informação sobre qual a melhor prescrição uma vez que, existe uma grande variedade de cancros e cada sujeito responde de modo diferente aos tratamentos desta patologia, sendo necessário proceder-se a uma avaliação clínica para a melhor prescrição (131).

De acordo com a ESSA (*Exercise and Sports Science Australia*), os pacientes com cancro devem ter como objetivo mínimo a prática de exercício físico de intensidade moderada, contudo não é aconselhável após uma operação cirúrgica ou fatores médicos individuais e presença de náuseas (132).

Para pacientes com cancro do pulmão, *Capozzi et al.* definiu as primeiras prescrições de exercício físico(133), que se encontram descritas na Tabela 2.

Tabela 2| **Recomendações gerais de prescrição do exercício para pacientes com cancro do pulmão.** Adaptado de Capozzi et al.et .(133)

F (frequência)	1 a 7 sessões/ semana
I (intensidade)	Baixa a vigorosa
T (tempo)	20 a 120 minutos/ sessão
T (tipo)	Aeróbio Resistência Flexibilidade

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais gerais

No trabalho de investigação desenvolvido no âmbito desta dissertação foram utilizados os materiais e equipamentos que constam na Tabela 3.

Tabela 3| **Lista de materiais e equipamentos** utilizados no trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação.

Material	Fabricante	Referência	Fornecedor
Materiais gerais			
Ácido acético			
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 de 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
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich®	S5761	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Cloreto de potássio (KC ₁ , ≥ 99%)	Sigma-Aldrich®	P5405	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Cloreto de sódio (NaCl, 99,0-101,5%)	VWR Chemicals	27810.295	Internacional, Belgium
Dimetilsulfóxido (DMSO, C ₂ H ₆ OS, ≥ 99,9%)	Sigma-Aldrich®	472301	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Filtros de seringa esterilizados (AC) 0,22 µm	Frilabo	MCA02522	Frilabo, Maia, Portugal
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , ≥ 99,0%)	Sigma-Aldrich®	P5379	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , ≥ 99%)	Sigma-Aldrich®	S0876	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Frascos de cultura, multipoços, tubos de centrifugação e pipetas serológicas	Instituto Superior Técnico	-	Coimbra
Glutaraldeído, 6,0% (v/v) (C ₅ H ₈ O ₂)	Sigma-Aldrich®	111308	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Hidróxido de sódio (NaOH, ≥ 98,0%)	Sigma-Aldrich®	71689	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal
Três poços de inserção	IBIDI®	80369	Enzifarma-S.A., Lisboa Portugal
Kit L-lactate (LAC)	Radox	LC2389	Irlandox Laboratories Lda., Porto, Portugal
Materiais gerais			
Meio RPMI-1640	Sigma-Aldrich®	R6504 × 1L	Sigma-Aldrich® Química S.A., Sintra Portugal

Material	Fabricante	Referência	Fornecedor
Placas multipoços (24 poços)	Frilabo	4430300N	Frilabo, Maia, Portugal
Placas multipoços (24 poços)	Costar [®]	3526	Frilabo, Maia, Portugal
Placas multipoços (96 poços)	Frilabo	4430100N	Frilabo, Maia, Portugal
Solução de tripsina de pâncreas suíno, 2,5% (p/v)	Sigma- Aldrich [®]	T4549	Sigma-Aldrich [®] Química S.A., Sintra Portugal
Soro fetal bovino	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
Unidade de filtro de seringa, 0,22 µm, PVDF, 33 mm	Millex [®]	SLGV033RB	Frilabo, Maia, Portugal
Violeta de Cristal 0,5% (w/v) (C ₂₅ N ₃ H ₃₀ Cl)	Sigma-Aldrich [®]	548629	Sigma-Aldrich [®] Química S.A., Sintra Portugal
Equipamentos gerais			
Autoclave	Prestige Medical	220140	Ezequiel Paão Jorge, Electromédica, Coimbra, Portugal
Balança (analítica)	Acculab	ALC-810.2	Sartorius, S.A, Lisboa, Portugal
Balança (precisão)	Acculab	ALC-210.4	Sartorius, S.A., Lisboa, Portugal
Balança digital	Seca	Model 770	
Banho de água	Clifton [®]	NEI- 14 79004	Frilabo, Lda., Porto, Portugal
Banho seco	Biogen Científica	AccuBlock Digital Dry Bath Model D1100	Biogen Científica Madrid, Spain
Câmara	Olympus	EP50	Olympus, Central Valley, USA
Centrifugadora	MPW Medical Instruments [®]	MPW-350R	MPW Medical Instruments [®] , Warsaw, Poland
Centrifugadora	Thermo Scientific [™]	Heraeus Labofuge 400R	
Incubadora de CO ₂	Sanyo	COM-19AIC(UV)	Sanyo, San Diego, USA
Leitor de microplacas	Biotek	µQuant	IZASA Portugal, Carnaxide, Portugal
Equipamentos gerais			
Medidor de pH	SevenCompact	S220	Mettler Toledo, Porto, Portugal
Microcentrifugadora	Eppendorf	Minispin	VWR International Lda., Carnaxide, Portugal
Microscópio ótico	Olympus	CKX53	Olympus, Central Valley, USA

Material	Fabricante	Referência	Fornecedor
Recipiente de azoto líquido	Cryo Diffusion S.A.S.	B2048	Cryo Diffusion S.A.S., Lery, France
Recipiente de congelação Mr. Frosty TM	Thermo Scientific TM	5001-001	VWR International Lda., Carnaxide, Portugal
Rotador de microplacas	Digisystem Laboratory Instruments Inc.	DSR 2800V	Reagente 5 Quimica e Eletronica Lda. Porto
Sistema de purificação de água	Millipore S.A.	Slimplicity [®] SIMS50000	Interface, Equipamento e Técnica Lda.,

2.2 Material biológico

A linha celular A549 utilizada em todas as experiências presentes nesta dissertação, foi obtida através da *American Type Culture Collection* (ATTC ref. CCL-185TM) e facultada pela Dr. Paulo Oliveira do grupo de Mitocôndria, Metabolismo e Doenças do Centro de Neurociências e Biologia Celular. A cultura celular para este projeto iniciou-se na passagem número 22.

As células cancerígenas A549 foram estabelecidas pela primeira vez por D.J Giard (134), através da remoção e cultivo de tecido carcinoma pulmonar do tumor de um homem caucasiano de 58 anos de idade. São caracterizadas por serem escamosas e responsáveis pela difusão da água e eletrólitos através dos alvéolos, têm a capacidade de sintetizar lecitina e contêm uma elevada percentagem de ácidos gordos insaturados que são responsáveis pela manutenção dos fosfolípidos da membrana. Quando expostas a cultivo *in vitro*, estas células crescem como monocamada e naturalmente aderem ao frasco de cultura, como representado na Figura 3 (135).

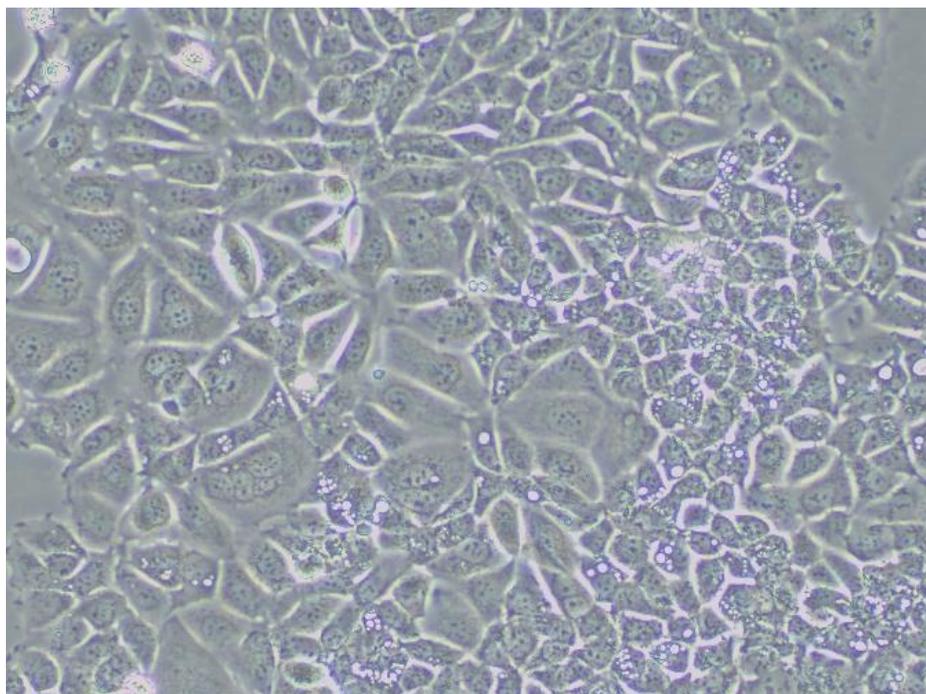


Figura 3| **Micrografia representativa (ampliação de 100×) das células A549 na passagem 24.** As imagens foram recolhidas no laboratório de cultura de células da FCDEF.

2.3 Cultura de células A549

Todas as soluções e meios utilizados no cultivo da linha celular A549 foram devidamente esterilizadas com água ultrapura, com exceção dos componentes de termolábeis, e foram autoclavadas com uma duração média de 15 ou 20 minutos (o tempo foi determinado consoante o tamanho da carga e o conteúdo), tendo sido a maioria autoclavada a uma temperatura de 121 °C (26 psi).

2.3.1 Meio da cultura

O meio de cultura utilizado foi previamente filtrado (Nalgene™ Rapid-Flow™ unidades filtrantes descartáveis estéreis com Membranas PES, 127-0020), suplementado com o soro fetal bovino (Life Technologies™, 10270-106) e armazenado a 4 °C.

Composição:

- Meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (Sigma–Aldrich[®], R6504 ×1L) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, em pó, adequado para a cultura celular em questão;
- NaHCO₃ (Sigma–Aldrich[®], S5761) a 2 g L⁻¹;
- pH ajustado a 7,1–7,3 através do medidor de pH;
- Soro fetal bovino (Vida Technologies[™], 10270–106) a uma concentração de 10% (v/v).

2.3.2 Soluções

Solução salina tamponizada com fosfato (PBS)

Composição:

- 1,37 mol dm⁻³ NaCl (99,0–101,5%, VWR Chemicals, 27810.295);
- 0,027 mol dm⁻³ KCl (> 99%, Sigma–Aldrich[®], P5405);
- 0,1 mol dm⁻³ Na₂HPO₄ (≥ 99%, Sigma–Aldrich[®], S0876);
- 0,02 mol dm⁻³ KH₂PO₄ (≥ 99,0%, Sigma–Aldrich[®], P5379).

Para se obter as concentrações acima mencionadas, foram adicionados a 500 mL de água ultrapura, 0,027 mol dm⁻³ de KCl e 0,02 mol dm⁻³ KH₂PO₄. Após a diluição total, o pH da solução foi ajustado utilizando soluções diluídas de HCl e NaOH, em adições gota-a-gota, até perfazer um pH de 7,4. A solução de trabalho PBS 1× foi preparada diluindo 10× a solução PBS 10×.

Solução aquosa de tripsina de pâncreas suíno, 0.25% (w/v)

Composição:

- 90 mL PBS 1×;
- 20 mg EDTA (> 99%, Sigma–Aldrich[®], E5134);
- 10 mL de tripsina pancreático suíno a 2,5% (w/v) (Sigma–Aldrich[®], T4549).

A solução PBS 1× e EDTA (90 mL) foi previamente autoclavada, de acordo com as instruções referidas no ponto 2.3, e uma alíquota de 10 mL de solução aquosa de

tripsina pancreático suíno a 2,5% (w/v) foi adicionada à solução. De referir que a alíquota mencionada estava armazenada no congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Iniciação da cultura de células

Para iniciar a cultura de A549, uma alíquota foi descongelada e transferida para um frasco T75 com meio de cultura pré aquecido. As células foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com 5% (v/v) de CO_2 / 95% (v/v) de ar. De seguida, o meio foi substituído para retirar o dimetilsulfoxido (DMSO), que é um constituinte do meio de congelação (Figura 4).

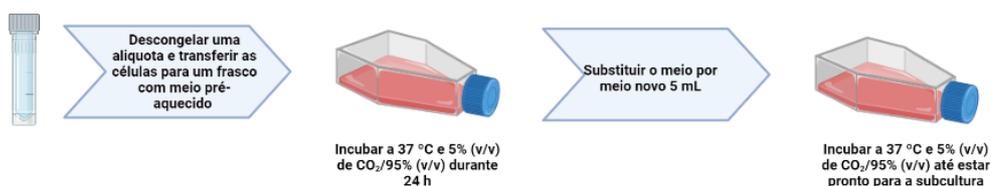


Figura 4| **Procedimentos para se iniciar a cultura de células A549.** Descongelamento de uma alíquota, transferidas para um novo frasco com meio pré aquecido. Depois de 24h incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% (v/v) de ar, o meio deve ser substituído por meio de cultura novo, com o objetivo de ser eliminar o DMSO e as possíveis células mortas. Posto isto, a cultura deve ser novamente incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% (v/v) de CO_2 /95% (v/v) até ter uma confluência apropriada para uma subcultura.

2.3.4 Rotina da cultura de células

As culturas foram mantidas incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ numa estufa humificada com 5% (v/v) de CO_2 /95% (v/v) de ar. Para iniciar o processo de cultura de células a densidade semeada foi de 2000 células/cm^2 , com passagem celular ao sétimo dia de incubação e com troca de meio de cultura ao quarto dia.

Todo o procedimento de passagem celular foi realizado dentro de uma câmara de fluxo em condições de assepsia. As culturas utilizadas foram cultivadas em frascos de 25 (T25) ou 75 (T75) cm^2 de área de crescimento conforme representado na Figura 4.

A realização da passagem efetuou-se de acordo com os seguintes processos:

1. Retirou-se o meio do T25 ou T75;
2. Lavou-se o T25 ou o T75 duas vezes com dois mL ou três mL de PBS respectivamente;
3. Colocou-se um ou três mL de tripsina por toda a superfície de crescimento, consoante se tratasse de T25 ou T75 (o efeito da tripsina foi crucial para a suspensão das células, uma vez que digere as proteínas da membrana envolvidas na aderência celular e no substrato da célula (136)).
4. O excesso de tripsina foi removido após 30 segundos de atuação. Logo de seguida o T25 ou o T75 ficou incubado durante dois minutos e 30 segundos, desta forma, as células ficam destacadas sendo facilmente detetadas, dado que se tornam redondas e mais pequenas como representado na Figura 5.

Considerando que é importante não perder a integridade celular e consequentemente provocar danos intracelulares, a tripsinização deve ser controlada. Para inibir a tripsina, normalmente são adicionados 5 mL ou 8 mL de meio ao frasco T25 ou T75 respectivamente.

5. A suspensão celular foi colocada dentro de um tubo de centrifugação para ser centrifugada a 300g durante cinco minutos. O sobrenadante foi retirado do T25 ou do T75 e o sedimento ressuspenso em cinco ou oito mL de meio de cultura, dependendo do tamanho do frasco.
6. Posto isto, um pequeno volume da suspensão celular foi retirado para realizar a contagem. Por fim, e efetuados os cálculos do número de células existentes na cultura, foram colocados noutros frascos (T25 ou T75) o volume de suspensão celular e o volume de meio necessários para que as mesmas cresçam.

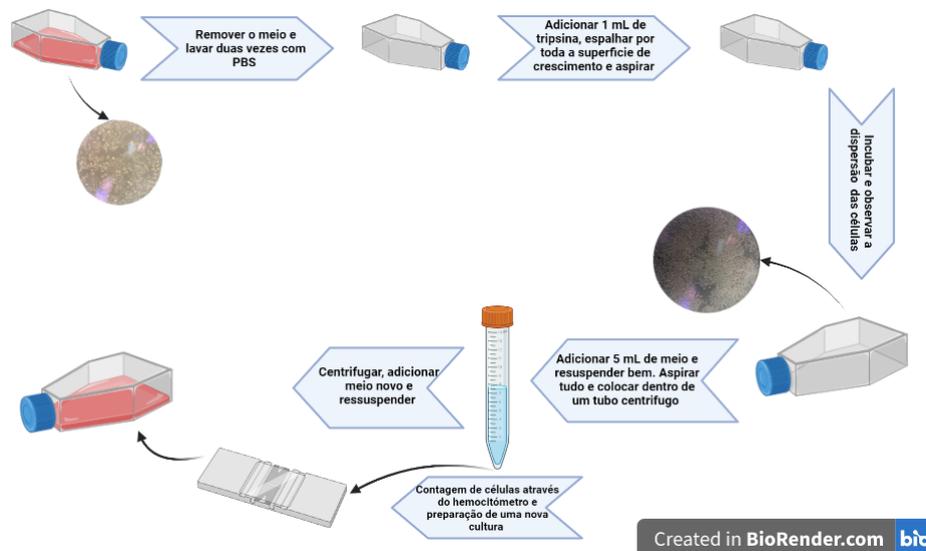


Figura 5| **Representação esquemática dos principais passos necessários para a subcultura celular.** A subcultura foi realizada com uma confluência aproximadamente de 80%. O meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após a tripsinização, as células foram recolhidas com meio e centrifugadas. O sobrenadante foi resuspenso num meio de cultura e, após contagem de células, um volume apropriado de suspensão celular foi transferido para um novo frasco.

2.3.5. Criopreservação celular

A criopreservação é um método de armazenamento que permite guardar as células viáveis durante vários anos. Através deste método as células são mantidas em azoto líquido a uma temperatura que ronda os $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (137,138). Sempre que necessário, as alíquotas congeladas podem ser descongeladas seguindo o processo descrito no ponto 2.3.4.

A criopreservação tem várias vantagens, nomeadamente a redução do risco de contaminação, a redução de contaminação cruzada com outras linhas celulares, a redução do risco de deriva genética e a redução de alterações morfológicas das células.

O processo de congelação é fundamental na medida em que mal efetuado pode ser letal para as células. O DMSO (uma pequena molécula que se difunde facilmente nas células) que é o mais utilizado como crioprotetor, dentro das células provoca uma

diminuição gradual da formação de cristais de gelo, alterações de pH e de proteínas desnaturadas. Contudo, esta pequena molécula é citotóxica e como tal não deve ser adicionada numa concentração a 10% (v/v) (139,140).

Para se iniciar o processo de congelação, as células antes de se atingirem uma grande confluência, devem ser transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas. O sobrenadante obtido da centrifugação deve ser ressuspensão no meio de cultura com soro fetal bovino (FBS) e com DMSO numa proporção de 7:2:1.

As alíquotas de um mL, que têm entre um a quatro milhões de células, devem ser transferidas para um contentor de congelação armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Mr. Frosty™) durante 24h.

O Mr. Frosty™ foi cheio com isopropanol, o que permitiu um arrefecimento progressivo das células, $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto. Posteriormente as células são armazenadas num recipiente de azoto líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ como mostra a Figura 6 (141).

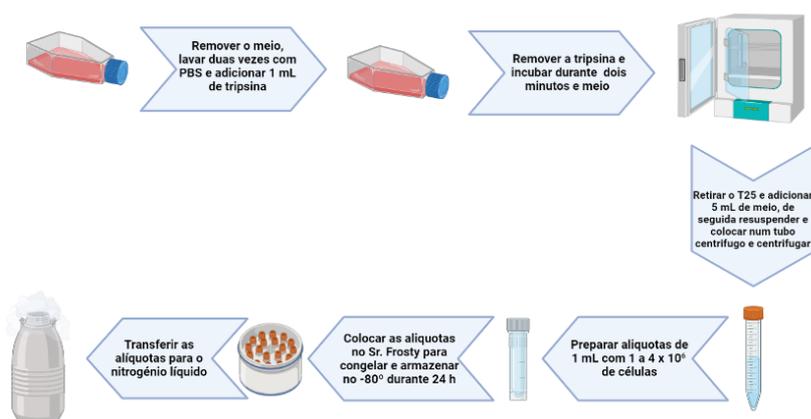


Figura 6| **Mr. Frosty** é um sistema que serve para que os tubos (1 a 5 mL) alcancem uma taxa de arrefecimento próxima de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, a taxa ideal para a preservação das células. Inicialmente deve ser armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas e posteriormente as células devem ser armazenadas num recipiente em azoto líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4 Contagem de células através do método de exclusão do azul de tripano

Para se realizar a contagem de células através do método de exclusão do azul de tripano foi necessário um microscópio invertido, um hemocítmetro e o corante azul tripano.

O azul de tripano é um corante bastante utilizado uma vez que oferece a vantagem de permitir a distinção entre células vivas e mortas (142) . Este corante permeia as células mortas, ou danificadas, corando o citoplasma de azul. Desta forma, são facilmente identificadas distinguindo-se das células vivas pois a membrana destas impede a penetração do corante ficando brilhantes quando vistas ao microscópio (139,142). Este método é bastante utilizado na cultura celular, nomeadamente na preparação de culturas para a realização de experiências, na determinação dos tempos de duplicação e nas avaliações de citotoxicidade.

Para a contagem celular, colocou-se um pequeno volume de suspensão celular justamente com o corante azul tripano (50 μ L de cada). Cada câmara do hemocítmetro deve ser preenchida fazendo-se de seguida a contagem como representado na Figura 7.

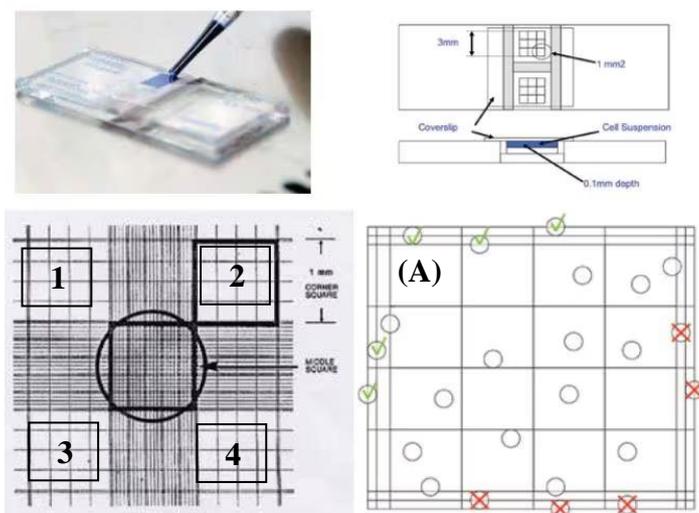


Figura 7| **Representação esquemática de um hemocítmetro.** Para se realizar a contagem de células é necessário colocar uma lamela sobre o hemocítmetro, posteriormente coloca-se a mistura de 50 μ L de azul tripano e 50 μ L de suspensão celular em ambas as câmaras de contagem. As células que estão nos quadrantes (1-4), são contadas como mostra o painel (A), assim as células que se encontram dentro da grelha e sobrepostas com a parte superior e as extremidades esquerda (círculos com visto verde) são incluídas na contagem, por outro lado os círculos com a cruz vermelha por estarem superpostos com os bordos direitos são excluídos.

Para que seja mantido uma homogeneidade celular é necessário que em cada rotina, ou preparação de experiências, sejam realizadas duas contagens de cada suspensão, sendo que, quando há uma diferença superior a 10% entre as duas, é necessário fazer uma terceira contagem.

Uma vez que o volume de cada câmara de contagem é de 1×10^{-4} mL, sabendo o valor médio de células nos oito quadrantes e tendo em conta o fator de diluição (2), é então possível calcular o número de células por mililitro (143).

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ mililitro} = x \times (\text{fator de diluição} \div 1 \times 10^{-4}) \quad \text{Equação 1}$$

x – representa o valor médio de células contadas nos oito quadrados.

2.5 Ensaios de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular são métodos usados para se estimar a quantidade de células viáveis através de alguns indicadores de funções celulares, como são exemplo a produção de ATP, a integridade da membrana plasmática, a aderência celular, a atividade de captação de nucleotídeos e a oxirregulação de coenzimas (144). Normalmente são ensaios que se realizam para avaliar as células metabolicamente ativas com resposta a estímulos extracelulares (145), a fármacos (146), a agentes químicos (147) ou com a finalidade de otimizar as condições de cultura celular (148) .

Os ensaios de viabilidade celular podem ser classificados pelo procedimento de quantificação celular, nomeadamente, métodos colorimétricos, por exclusão de corante, e luminométricos (149). Nos métodos colorimétricos, conseguimos a partir da medida de absorvância por espectrofotometria, avaliar a quantidade de células viáveis (150). Os métodos colorimétricos são muito utilizados por serem de rápida aplicação e fácil automação.

Os ensaios de quantificação de L-lactato, de sulforodamina B (SRB) e clonogénico, realizados no âmbito desta dissertação, classificam-se como métodos colorimétricos (150).

2.5.1 Quantificação do L-lactato

O L-lactato presente no meio de cultura foi quantificado recorrendo a um ensaio enzimático. O aumento dos níveis de concentração de L-lactato indicam que há um aumento das taxas de fermentação do ácido láctico (151).

O reagente utilizado na preparação deste ensaio veio em forma de duas soluções: reagente 1 (R1b) que contém NADH e reagente 2 (R1a) que contém uma solução tampão com um pH de 7,5 e suplementado com piruvato de sódio e fosfato salino. As soluções foram misturadas na proporção de 4:1 (v/v) (152).

O objetivo deste ensaio foi estimar a produção de L-lactato durante três horas nos meios de culturas expostas a diferentes soros condicionados por exercício. Os aumentos de concentrações indicam aumentos das taxas de fermentação do ácido láctico.

Procedimentos:

As culturas foram preparadas numa placa de 96 poços. Após 72h de incubação, o meio foi removido e adicionou-se 100 μ L de meio suplementado com 10% de soro humano condicionado pelo exercício. Após este processo, foram novamente incubadas durante três horas. De seguida, procedeu-se à recolha de 6 μ L do meio e adicionou-se 200 μ L de solução (R1b e R1a). Para terminar, a placa foi mantida em agitação entre cinco e dez minutos e procedeu-se à leitura da absorbância a 550 nm no leitor de microplacas como representado na Figura 8.



Figura 8| **Leitor de microplacas** com a capacidade de fazer leituras a um valor de absorbância de 550 nm de comprimento de onda.

A curva padrão (A_{550} versus concentrações de lactato) foi obtida através de cinco soluções aquosas de L-lactato. A cada amostra foram ajustados os valores de lactato e da água ultrapura como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4| **Volumes da solução utilizadas para a preparação da curva padrão para análise da quantificação do L-lactato**, obtida através do Kit Randox (152).

Amostras	Lactato	Água ultrapura	Concentrações de L-lactato
Amostra 1	0 μL	6 μL	0 mM
Amostra 2	1,5 μL	4,5 μL	1,095 mM
Amostra 3	3 μL	3 μL	2,190 mM
Amostra 4	4,5 μL	1,5 μL	3,285 mM
Amostra 5	6 μL	0 μL	4,380 mM

2.5.2. Sulforodamina B

O ensaio SRB é um teste colorimétrico que permite quantificar indiretamente a toxicidade dos compostos nas células aderentes. Este método foi desenvolvido por Skehan em 1990 (153).

A SRB é uma molécula composta por três anéis interligados: o xanteno, dois grupos dietilaminas e um anel di-hidroxosulgonico (monossacarídeo). Esta molécula possui uma alta afinidade por interação eletrostática com aminoácidos catiónicos (arginina, histidina e lisina) em condições ácidas moderadas.

Após o tempo de incubação, as células devem ser fixadas e os aminoácidos catiónicos devem estar com carga superficial positiva. Esta positividade irá permitir que todo o excesso de SRB seja descartado, restando apenas uma quantidade proporcional à quantidade de proteínas ligantes, que por sua vez é proporcional ao número de células viáveis.

Este teste permite estimar a densidade celular através da medição do conteúdo proteico, densidade essa que pode, por sua vez ser utilizada para avaliar a proliferação celular, entre muitos outros parâmetros.

Procedimentos:

Depois de um período de incubação com meio suplementado com soro condicionado (24h ou 72h) as culturas foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (wt/vol), permitindo a aceleração das proteínas celulares através da interação eletrostática entre os íões tricloroacético e as amins primárias. Após este período procedeu-se à lavagem com água, para que fosse possível adicionar a SRB, aguardando-se meia hora para que ocorresse uma atuação deste corante.

De seguida, a SRB foi solubilizada pelo menos quatro vezes com ácido acético a 1% (vol/vol). O corante que está ligado à proteína foi diluído numa solução base Tris 10 mM o que permitiu realizar a leitura da placa através de um leitor de microplacas com um comprimento de onda de 550 nm (154).

2.5.3 Ensaio clonogénico

O violeta de cristal é um corante com propriedades antibacterianas, antitumorais e antifúngicas (155). Este corante é muito utilizado para a coloração de Gram (156) e para a quantificação de células aderentes (157). O ensaio clonogénico avalia a citotoxicidade, propriedade prejudicial de uma substância em relação às células, e avalia a capacidade de uma única célula desenvolver uma colónia, permitindo assim determinar a sobrevivência celular. Este ensaio foi desenvolvido por Saotome (158).

Procedimentos:

As culturas foram preparadas numa placa de 24 poços. Após 10 dias de incubação com meio suplementado com soro humano condicionado, o meio da cultura foi removido de cada poço sendo cada um deles lavado com PBS (500 μ L).

Em cada poço foram adicionados 300 μ L de solução de violeta de cristal a 0,5% (m/v) para que fosse possível interagir com as proteínas e com o DNA das células saudáveis remanescentes. As culturas foram mantidas nestas condições em temperatura ambiente durante 40 minutos. Posteriormente o corante que não se ligou às células foi removido e os poços foram lavados com água. Por fim, todos os poços foram fotografados e o tratamento de imagens foi feito no programa *Imagej*, como mostra a Figura 9.

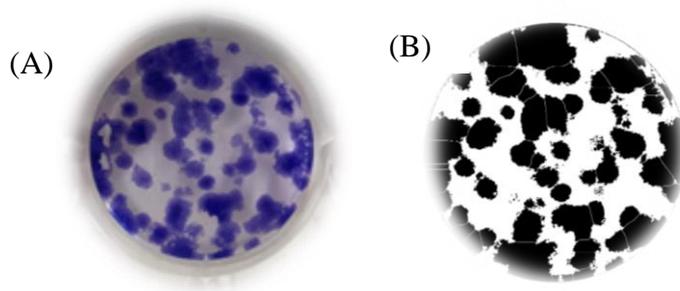


Figura 9| **Ensaio clonogénico antes do tratamento de imagem (A) e após o tratamento (B).** Este ensaio permite obter informações quantitativas sobre a citotoxicidade celular. As imagens foram recolhidas no laboratório de cultura de células da FCDEF.

2.5.4 Migração celular

O ensaio ferida é um método simples que estuda a migração de células cancerígenas *in vitro*. Baseia-se na observação de células que crescem em monocamada e migram para restabelecer os contactos celulares após o desenvolvimento de uma ferida artificial. Os comportamentos das células regulam a cicatrização de feridas durante as fases de proliferação e migração (159).

Procedimentos:

Para este ensaio foi necessário criar uma ferida numa monocamada de células (através da utilização de três poços com inserção, IBIDI®) seguindo-se a recolha de imagens às 0h e às 18h. Estas imagens permitiram analisar e comparar a área sem células nos tempos iniciais (0h) e tempos finais (18h) através do programa *ImageJ* como mostra a Figura 10.

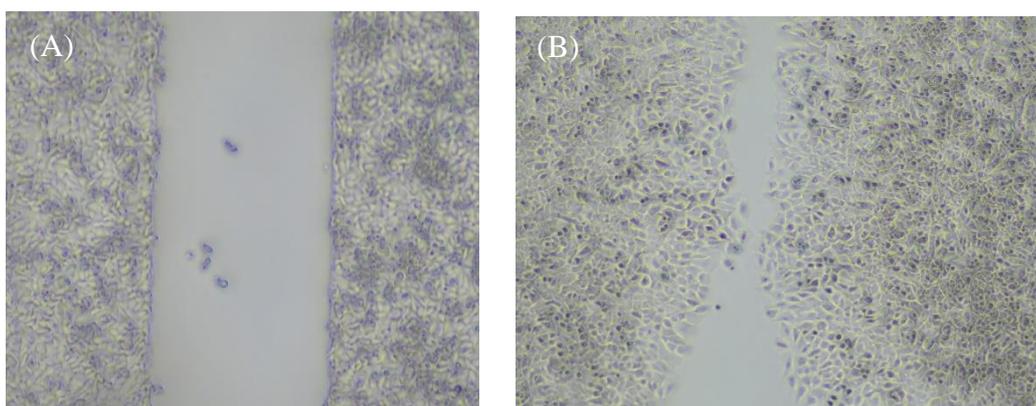


Figura 10| **Ensaio ferida às 0h (A) e após 18h (B).** Este ensaio permite obter informações sobre a taxa de migração das células. As imagens foram recolhidas no laboratório de cultura de células da FCDEF.

2.6. Desenho do estudo

Para a realização desta dissertação foram utilizados soros de um ensaio controlado randomizado que recolheu amostras de idosos não institucionalizados intervencionados com um programa de exercício aquático (160). Todo o estudo desenvolvido por Farinha et al. foi realizado de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia sobre os Estudos Humanos (161).

O estudo de Farinha et al (160) debruçou-se na análise do impacto de diferentes programas de exercício aquático no perfil imunológico dos idosos. Os programas de exercício aquático utilizados dividiram-se em aeróbio (AerG), exercício intervalado (IntG) e exercício combinado (ComG). As amostras sanguíneas foram recolhidas em dois momentos específicos, pré-intervenção (basal, momento 1) e pós-intervenção (após 28 semanas, momento 2) em tubos de colheita de soro que foram depois centrifugados a 3000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser utilizado no meio de cultura celular.

2.7. Protocolos de exercício

Os três programas de exercício tiveram uma duração de 28 semanas, com dois treinos por semanas em dias não consecutivos. Todos os programas possuíam características semelhantes: uma duração de 45 minutos, que segundo Rynders (162) é o tempo suficiente alterar os padrões na população idosa, todos os protocolos foram em meio aquático, com um nível de água entre 0,80 e 1,20 m e temperatura que rondava os $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todas as sessões foram divididas em três partes: a parte inicial, parte principal e parte final. A primeira parte teve uma duração de dez minutos onde se pretendia que houvesse uma adaptação e aclimatização ao meio aquático através de exercícios simples, nomeadamente deslocamentos laterais e movimentos isolados. Após os dez minutos, os exercícios iam progressivamente aumentando tanto a complexidade como a intensidade durante 30 minutos. Posto isto, a parte final com uma duração de cinco minutos tinha o propósito de relaxamento e diminuição da frequência cardíaca (FC) através de alongamentos dos grupos musculares.

O que distinguiu cada protocolo de exercício foi a parte principal como mostra a Tabela 5 porém é de salientar que todas as sessões foram realizadas de acordo com as recomendações do *American College of Sports Medicine* (163) e realizada por técnicos especializados em exercício físico.

Tabela 5| **Características dos programas de exercício físico.** Para cada programa foi estipulado uma determinada intensidade e um tipo de exercício para os 30 minutos de sessão.

Programa	Descrição	Intensidade (1-13 semana)	Intensidade (14-28 semana)	Exercícios
AerG	30 minutos de exercício aeróbio (intensidade moderada)	60-65% frequência cardíaca máxima	65-70% frequência cardíaca máxima	Hidrogenástica básica com variações de exercícios: correr, saltar, pontapear, salto com pêndulo.
IntG	10 minutos de exercício aeróbio (intensidade moderada) 5 minutos de exercício aeróbio (alta intensidade) 10 minutos de exercício aeróbio (intensidade moderada) 5 minutos de exercício (alta intensidade)	60-65% frequência cardíaca máxima 70-75% frequência cardíaca máxima 60-65% frequência cardíaca máxima 70-75% frequência cardíaca maxima	65-70% frequência cardíaca maxima 75-80% frequência cardíaca máxima 65-70% frequência cardíaca máxima 75-80% frequência cardíaca maxima	Hidrogenástica básica com variações: correr, saltar, pontapear, salto com pêndulo.
CombG	15 minutos de exercício aeróbio (intensidade moderada) 15 minutos de exercício reforço muscular	60-65% frequência cardíaca maxima 2 séries de 12 repetições	65-70% frequência cardíaca máxima 3 séries de 16 repetições	Hidrogenástica básica com variações: correr, saltar, pontapear, salto com pêndulo. Exercícios com equipamento.

A monitorização da frequência cardíaca foi feita através do uso de um Polar V800 durante os diferentes programas de exercício físico. A intensidade para cada programa foi ajustada em conformidade com a Tabela 5. Para precaver qualquer situação e como medida de segurança, a intensidade foi também calculada indiretamente utilizando a equação (164):

$$1) \text{ Frequência cardíaca alvo} = (\text{Frequência Cardíaca máxima} - \text{Frequência Cardíaca em Repouso}) \times \text{intensidade} + \text{Frequência Cardíaca em repouso}$$

A frequência cardíaca máxima foi calculada mediante a população alvo (idosos) (165)

$$2) \text{ Frequência cardíaca máxima} = 207 - (0,7 \times \text{idade}).$$

2.8 Amostra

Para o desenvolvimento desta dissertação foram selecionadas 12 participantes, três de cada grupo (aeróbio, intervalado e combinado) e três do grupo controle, todos os participantes eram do sexo feminino, com as características detalhadas na Tabela 6.

Tabela 6l. **Características basais da amostra.** Adaptado do estudo de Farinha et al. (160)

	Grupo Aeróbio (N=3)	Grupo Intervalado (N=3)	Grupo Combinado (N=3)	Grupo Controle (N=3)
Idade (anos)	66.33 ± 1.53	69	75.33 ± 6.43	72.67 ± 6.66
Peso (kg)	65.03 ± 10.80	77.67 ± 23.20	74.43 ± 6.04	82.90 ± 15.58
Altura (m)	1.56 ± 0.030	1.54 ± 0.02	1.55 ± 0.044	1.54 ± 0.02
IMC (kg/m ²)	26.23 ± 3.52	32.37 ± 9.15	30.80 ± 1.45	85.33 ± 14.35
Gordura Visceral (%)	8.33 ± 2.08	12.67 ± 3.79	13.00 ± 1.00	15.00 ± 1.00
Massa gorda M1 (%)	38.30 ± 4.92	44.00 ± 7.38	43.20 ± 4.14	47.10 ± 6.89
Massa gorda M2 (%)	36.27 ± 6.05	44.07 ± 4.31	41.30 ± 8.60	46.67 ± 6.18
Massa muscular M1 (%)	25.80 ± 1.38	24.13 ± 2.37	24.66 ± 2.07	21.67 ± 1.27
Massa muscular M2 (%)	27.17 ± 1.95	24.07 ± 0.78	25.97 ± 4.33	22.00 ± 0.75

Os critérios de inclusão e de exclusão para a participação no estudo descrito na Tabela 7.

Tabela 7| Critérios de inclusão e de exclusão para a participação no estudo de Farinha et al. (165).

Inclusão
<ol style="list-style-type: none">1. Participantes de ambos os sexos;2. 65 anos ou mais;3. Não institucionalizados;4. Autonomia para se deslocar da sua residência até à piscina municipal da Sertã;5. Preenchimento do termo de consentimento informado;6. Indivíduos com autorização médica para a prática de exercício físico em meio aquático (nos casos em que houvesse alguma complicação clínica ou comorbidade).
Exclusão
<ol style="list-style-type: none">1. Indivíduos com patologias diagnosticadas clinicamente que possam pôr em risco a sua saúde e a de terceiros durante a prática de exercício físico em meio aquático;2. Indivíduos que obtiveram pontuação inferior a nove pontos no mini teste do estado mental (indicando comprometimento cognitivo grave) ou foram diagnosticados clinicamente com uma doença mental.

2.9 Análise estatística

Para uma melhor análise de resultados, recorreremos ao software IBM SPSS Statistics. Considerando o número de amostras (sempre inferior a 30) utilizamos apenas testes não paramétricos.

Para os ensaios de citotoxicidade e de determinação celular foram utilizados o *Knuskall-Wallis* (avalia três ou mais grupos diferentes no mesmo momento) e o *U de Mann Whitney* (avalia dois grupos diferentes no mesmo momento).

No ensaio clonogénico e no ensaio ferida o teste estatístico utilizado foi *Wilcoxon* (avalia o mesmo grupo em dois momentos diferentes).

3. Resultados

A partir das amostras de soro armazenadas a -80°C , foi possível estudar os efeitos de três programas diferentes de exercício físico aquático com a duração de 28 semanas na transformação celular de uma linha celular de cancro de pulmão A549. Todos os ensaios abaixo descritos foram realizados em triplicado (com exceção do ensaio ferida).

3.1 Efeito dos programas de exercício físico na transformação celular

3.1.1 Ensaio de quantificação de lactato

O ensaio de lactato avaliou a capacidade de fermentação láctica quantificando o L-lactato presente no meio de cultura do ensaio SRB (151). Os possíveis aumentos dos níveis de concentração de lactato indicam que houve um aumento das taxas de fermentação do ácido láctico, como representado na Figura 11.

Os objetivos deste ensaio foram perceber se a adição de soro humano condicionado pelos diferentes tipos de exercício era capaz de alterar o fenótipo metabólico das células de cancro de pulmão A549. Ou seja, se havia ou não diferenças estatisticamente significativas na exposição das células aos soros condicionados por diferentes programas de exercício recolhidos no momento 1 (M1 – antes da intervenção com exercício) e o momento 2 (M2 – após uma intervenção de 28 semanas).

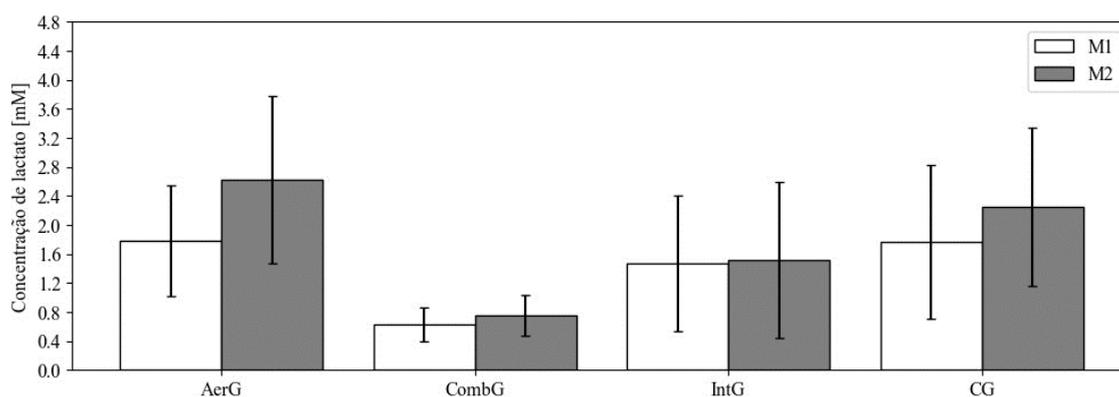


Figura 11| **Comparação dos valores de fermentação láctica** com o respetivo desvio padrão na quantificação do L-lactato presente no meio com soro das amostras no M1 e M2. Resultados referentes a três sujeitos de cada grupo em triplicado.

O valor de significância (sig.) para o M1 foi de 0.443 e para o M2 foi de 0.256 logo não existiram diferenças estatisticamente significativas no M1 e M2 em função dos programas de exercício realizado.

Na Figura 12 é possível verificar os valores de fermentação láctica através da quantificação do L-lactato presente no meio com soro humano de cada amostra nos dois momentos. Pode ver-se que existe uma tendência para um valor maior de L-lactato no meio com os soros de M2, com exceção do indivíduo S8, S7 e S5.

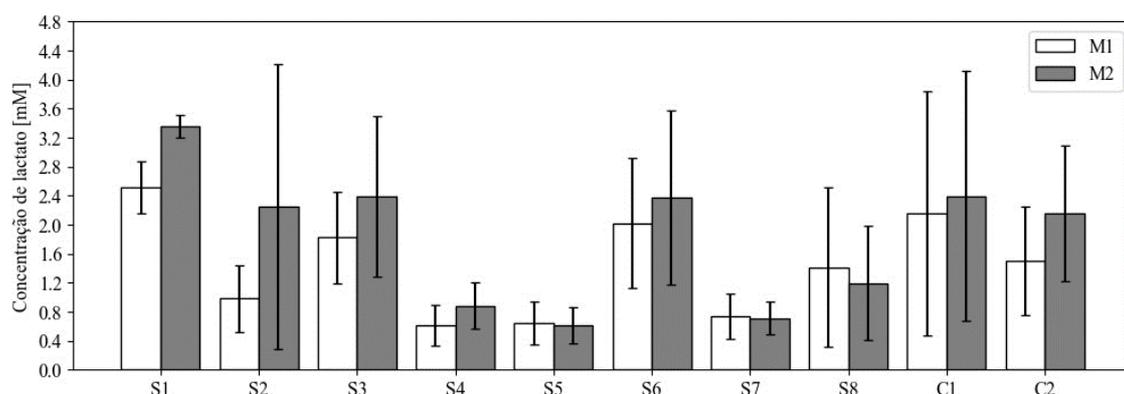


Figura 12| Valores de fermentação láctica de cada amostra, no M1 e M2. O S representa cada sujeito (mulheres) e C representa os controles. Grupo Aeróbio (S1-S3), Grupo Combinado (S4 e S5), Grupo Intervalado (S6-S8). Para todos os valores estão também os respetivos desvios-padrão.

Através da Figura 13 fomos comprar o grupo de intervenção (grupo aeróbio, grupo intervalado, grupo combinado) com o grupo controle. O objetivo foi analisar se havia ou não diferenças estatisticamente significativas no grupo de intervenção em comparação com o grupo controle.

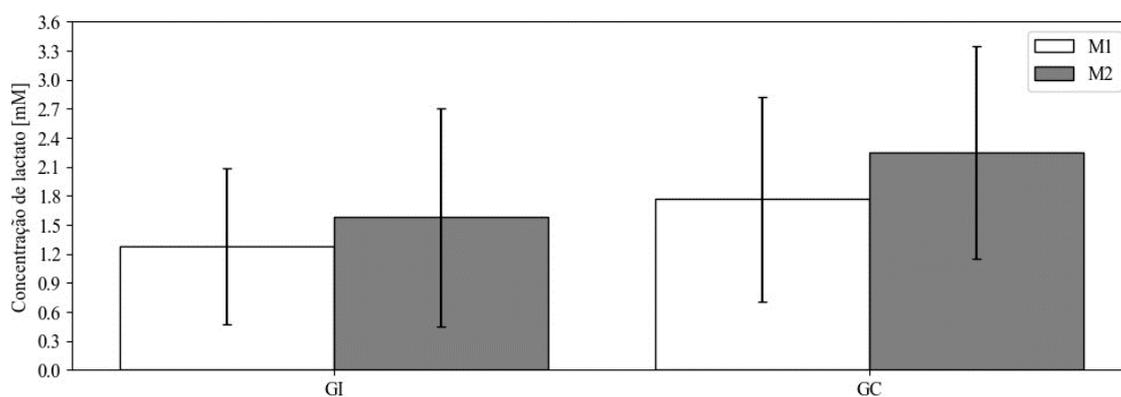


Figura 13| **Valores de fermentação láctica** do grupo de intervenção (GI) e do grupo controle (GC) no M1 e M2.

O valor de significância (sig.) para o M1 foi de 0.074 e para M2 foi de 0.103, logo não existiram diferenças estatisticamente significativas no grupo de intervenção em comparação com o grupo controle, tanto no M1 como no M2. Contudo é notório uma concentração mais elevada de L-lactato no grupo de controle comparativamente ao grupo de intervenção, em ambos os momentos.

3.1.2 Determinação da densidade celular

Um outro ensaio realizado teve como intuito de avaliar a densidade celular através da medição do conteúdo proteico, foi realizado-se o ensaio SRB, valores representados na Figura 14.

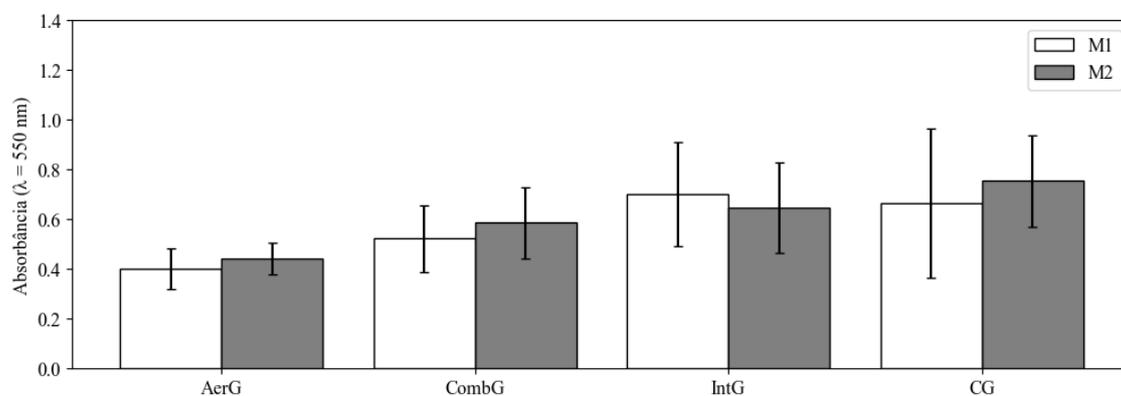


Figura 14| **Comparação dos valores de densidade celular (M1 e M2)** através da medição do conteúdo proteico com um valor de absorvância de 550nm.

O objetivo para este teste focou-se em perceber se havia ou não diferenças estatisticamente significativas no M1 e M2 em função dos programas de exercício realizados.

O valor de significância (sig.) para M1 foi de 0.440 e para M2 foi de 0.350, logo não existiu diferenças estatisticamente significativas no M1 e M2 em função dos programas de exercício realizados.

Nas Figura 15 é possível verificar os valores de densidade celular através da medição do conteúdo proteico presente no meio com soro de cada amostra, em M1 e M2.

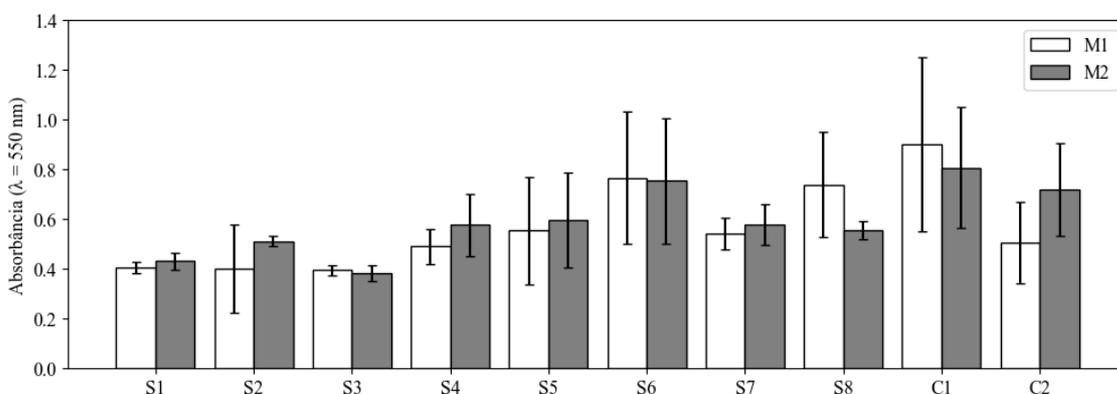


Figura 15| **Valores de densidade celular (M1 e M2) lidos a uma absorbância de 550 nm.** O S representa cada sujeito (mulheres) e C representa os controles. Grupo Aeróbio (S1-S3), Grupo Combinado (S4 e S5), Grupo Intervalado (S6-S8). Para todos os valores estão também os respetivos desvios-padrão.

O valor de significância (sig.) para M1 foi de 0.403 e para M2 foi de 0.310, logo não existiu diferenças estatisticamente significativas no M1 e M2 em função dos programas de exercício realizados.

A maioria dos sujeitos apresenta valores de absorbância em M2 superior, com exceção do S8 que apresenta uma redução considerável, também o S3 apresenta uma ligeira redução.

Através da Figura 16 fomos comparar o grupo de intervenção (grupo aeróbio, grupo intervalado, grupo combinado) e com o grupo controle. O objetivo foi perceber se havia ou não diferenças estatisticamente significativas no grupo de intervenção em comparação com o grupo controle.

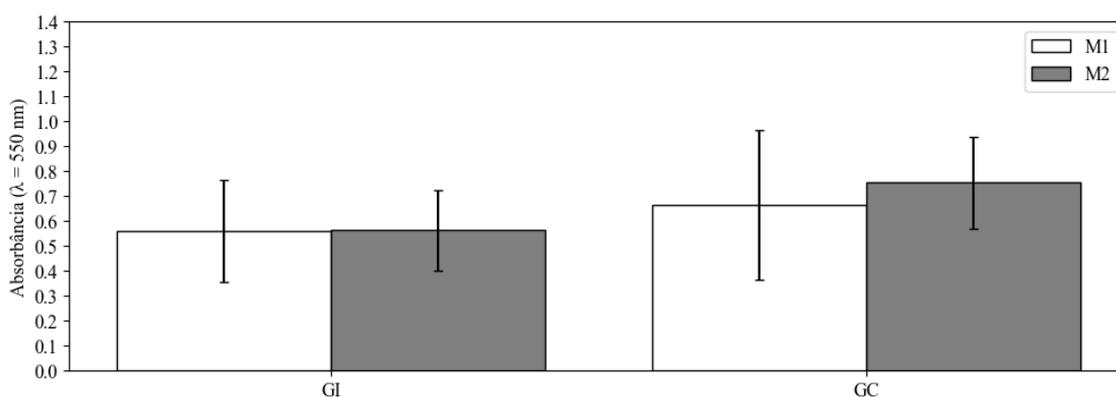


Figura 16| **Valores de densidade celular** do grupo de intervenção (GI) e do grupo controle (GC) no M1 e M2.

O valor de significância (sig.) para M1 foi de 0.060 e para M2 foi de 0.105, logo não existiram diferenças estatisticamente significativas no grupo de intervenção em comparação com o grupo controle, tanto no M1 como no M2.

3.1.3 Ensaio clonogénico

O ensaio clonogénico foi realizado com os soros condicionados pelos grupos de exercício aeróbio e intervalado, devido à falta de amostra de soro para os outros grupos.

O ensaio clonogénico permite perceber a capacidade de células isoladas crescerem e formarem colónias. Na Figura 17 e 18 são representados os resultados obtidos para o grupo aeróbio e intervalado no M1 e M2. É de salientar que o tratamento e o tempo de exposição foram iguais para os dois grupos.

As culturas expostas ao soro condicionado pelo programa de exercício aeróbio, demonstraram ter uma tendência para diminuição da capacidade de formar colónias, ainda que a diferença não seja significativa.

Para o grupo aeróbio (Figura 17), o valor do sig. foi de 0.109 ou seja, superior a 0,05 logo não existiu diferenças estatisticamente significativas na capacidade das células A549 crescerem e formarem colónias nos dois momentos diferentes (M1 e M2).

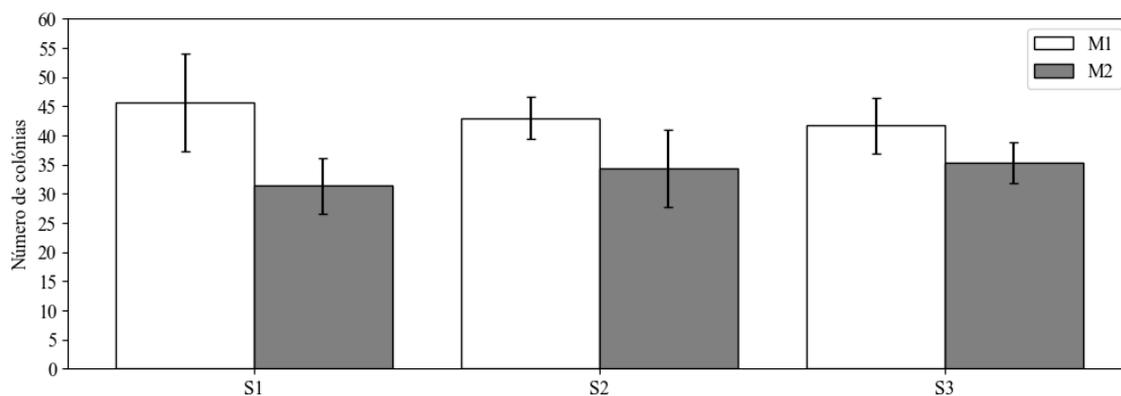


Figura 17| **Capacidade de as células A549 crescerem e formarem colónias** com soro de mulher do grupo aeróbio M1 e M2.

O mesmo ensaio foi realizado para o grupo intervalado e os resultados estão representados na Figura 18.

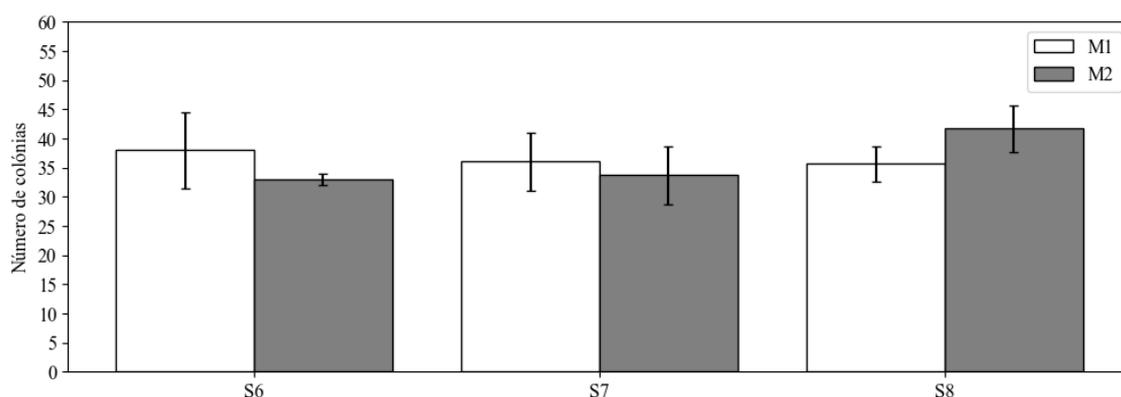


Figura 18| **Capacidade das células A549 crescerem e formarem colónias** com soro de mulher do grupo intervalado M1 e M2.

De acordo com as Figuras 17 e 18 os resultados sugerem que do M1 para o M2 houve uma tendência para a diminuição na capacidade de formação de colónias, com exceção das células expostas ao soro do indivíduo S8 (Figura 18). Os resultados sugerem ainda que as intervenções com exercícios aeróbio e intervalado poderão diminuir a capacidade das células formarem colónias.

Para o grupo intervalado (Figura 18), o valor do sig. foi de 0.564 ou seja, superior a 0,05 não existiu diferenças estatisticamente significativas na capacidade das células A549 crescerem e formarem colónias nos dois momentos diferentes (M1 e M2).

Por outro lado, fomos também analisar a área ocupada pelas colónias para entender a capacidade das células crescerem e ligar-se a outras, como representados na Figura 19 para o grupo aeróbio e na Figuras 20 para o grupo intervalado. Em ambas as situações, a área total ocupada pelas colónias formadas é semelhante no M1 e M2.

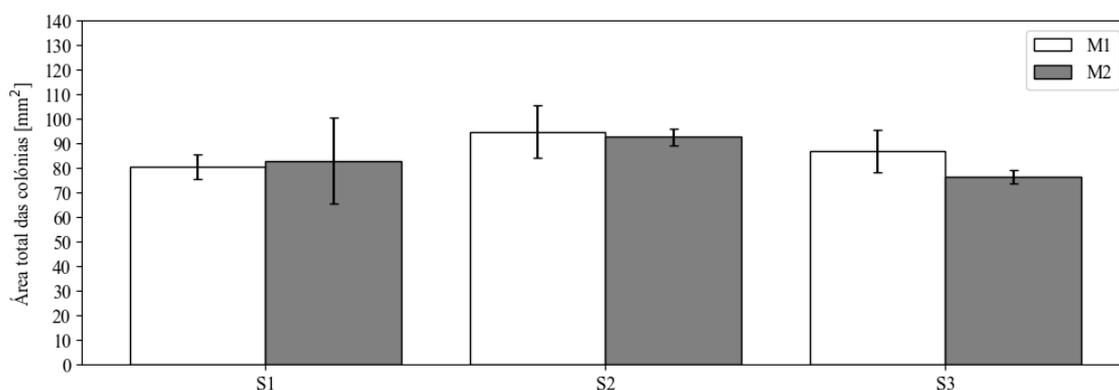


Figura 19| Área ocupada pelas colónias em mm² após 10 dias de incubação, no grupo aeróbio, no M1 e M2.

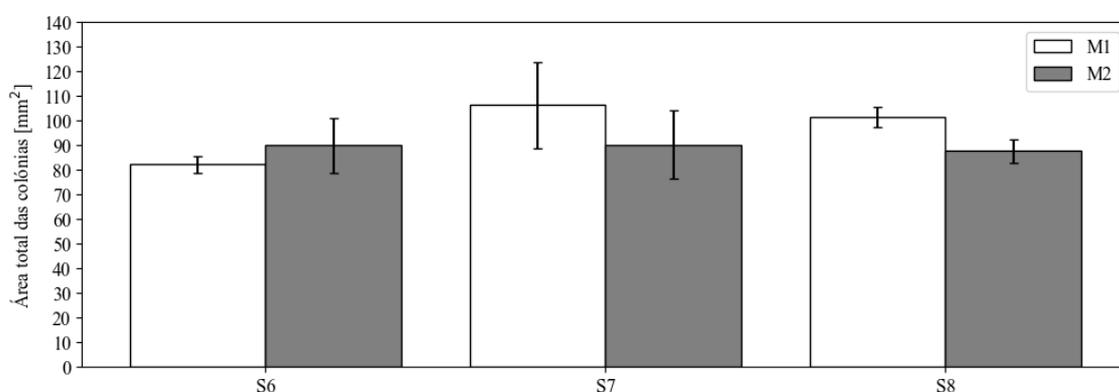


Figura 20| Área ocupada pelas colónias em mm² após 10 dias de incubação, no grupo intervalado, no M1 e M2.

Relativamente ao grupo aeróbio (Figuras 19), o valor de sig. foi de 0.593 ou seja, superior a 0,05 logo não existiu diferenças estatisticamente na área ocupada pelas colónias em dois momentos diferentes M1 e M2.

No grupo intervalado (Figuras 20), o valor de sig. foi de 0.285 ou seja, superior a 0,05 logo não existiu diferenças estatisticamente na área ocupada pelas colónias em dois momentos diferentes M1 e M2.

Na Figura 21 é possível verificar os poços e as respectivas diferenças do ensaio clonogénico obtidas entre o M1 (A) e M2 (B) no grupo aeróbio. Também na Figura 22 é possível verificar os poços e as respectivas diferenças do ensaio clonogénico obtidas entre o M1 (A) e M2 (B) no grupo intervalado.

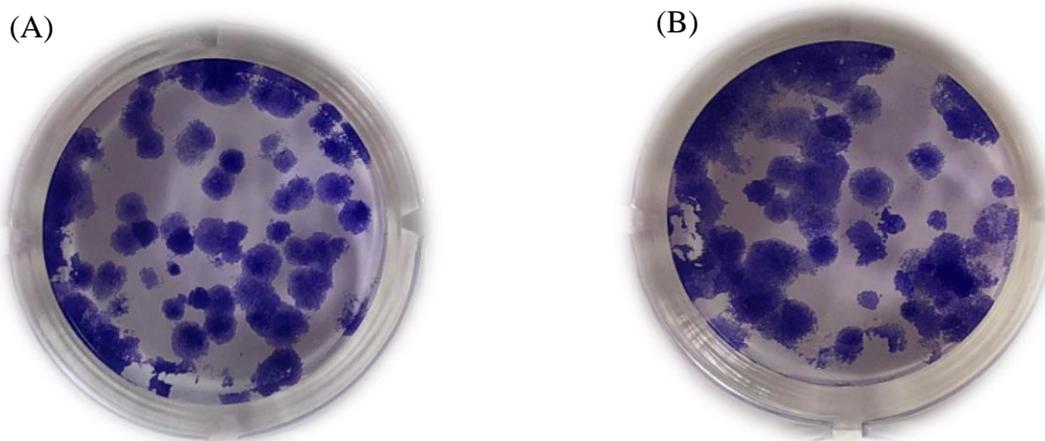


Figura 21| **Ensaio clonogénico após 10 dias de incubação**, do grupo aeróbio no M1 (A) e M2 (B).

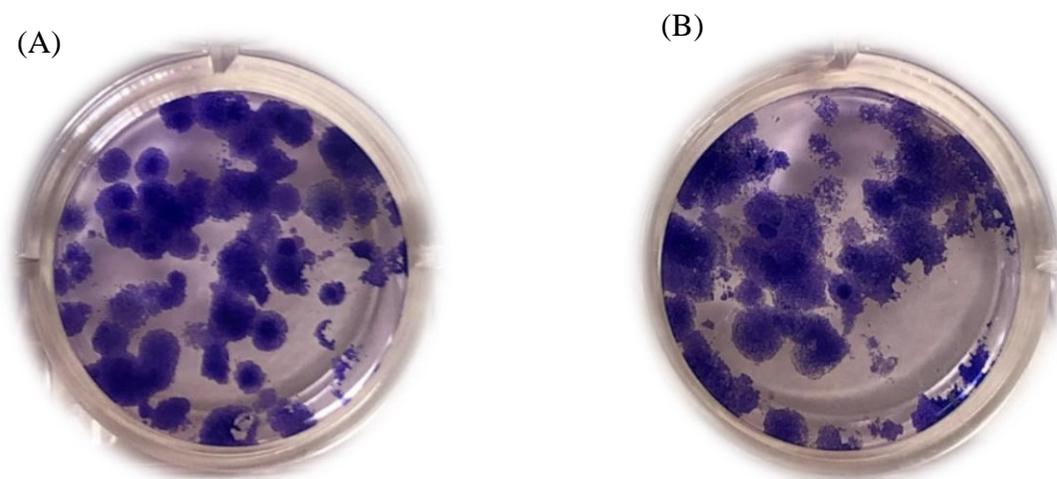


Figura 22| **Ensaio clonogénico após 10 dias de incubação**, do grupo intervalado no M1 (A) e M2 (B).

3.1.4 Ensaio ferida

O ensaio ferida permitiu estudar a capacidade de migração das células A549 na presença dos diferentes soros em avaliação. Este ensaio baseou-se na observação das células que cresceram em monocamada e migram para restabelecer os contactos celulares após o desenvolvimento de uma ferida. Os resultados estão representados na Figura 23 para grupo de exercício aeróbio e Figura 24 pelo grupo de exercício intervalado. A análise do ensaio foi feita em dois momentos diferentes (0h e 18h).

O objetivo focou-se em verificar se existiram ou não diferenças estatisticamente significativas na área de migração das células às 0h e 18h nos dois momentos diferentes (M1 e M2).

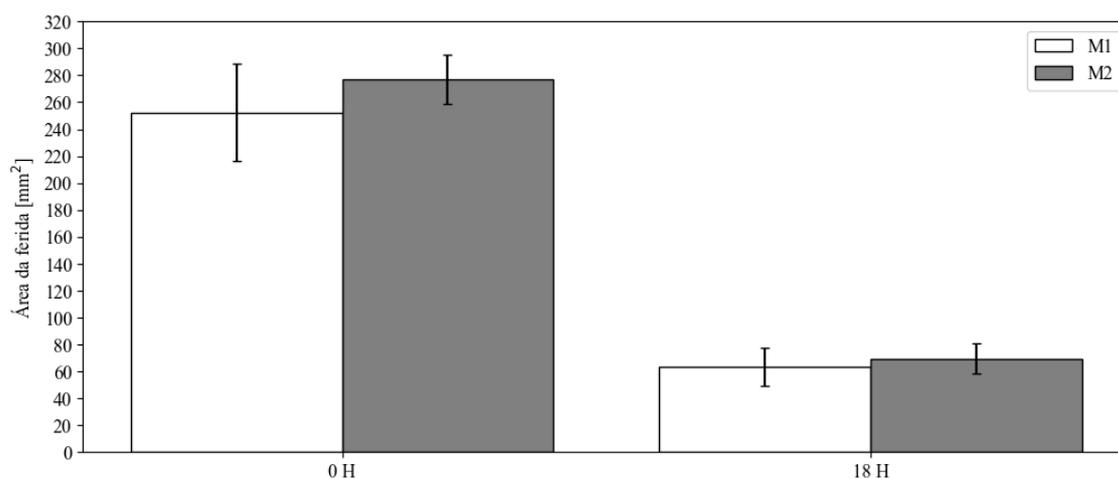


Figura 23| Área de migração de células A549 com soro de mulher do grupo aeróbio (M1 e M2).

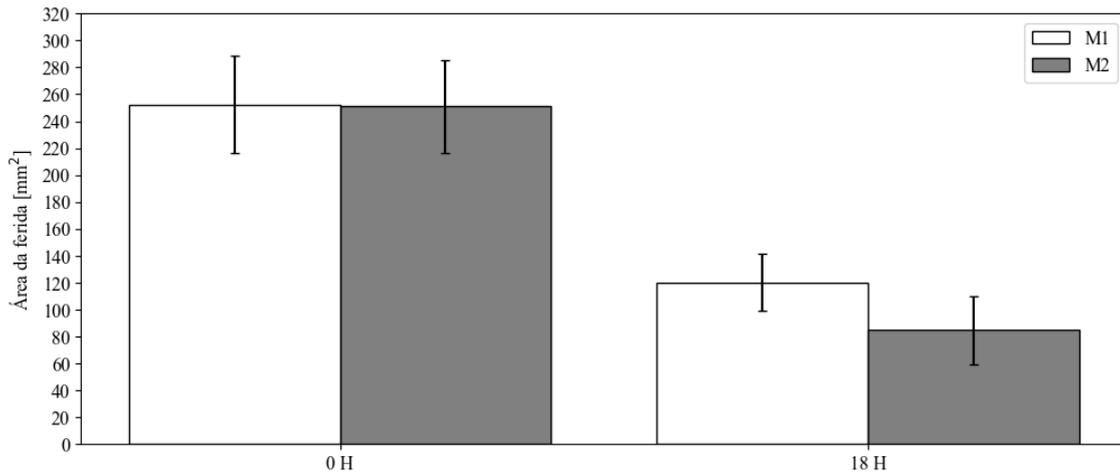


Figura 24| **Área de migração de células A549** com soro de mulher do grupo intervalado (M1 e M2).

Para o grupo aeróbio (Figuras 23), o valor de sig. foi de 0.157, logo não existiu diferenças estatisticamente significativas na área de migração das células às 0h e 18h nos dois momentos diferentes (M1 e M2). Nota-se, no entanto que existiu uma tendência para a diminuição da área de migração das células cancerígenas com soros colhidos em M2 após a realização das 28 semanas de exercício aeróbio.

No grupo intervalado (Figuras 24), o valor de sig. foi de 0.180, logo não existiu diferenças estatisticamente significativas na área de migração das células às 0h e 18h nos dois momentos diferentes (M1 e M2) Também neste caso se nota que existe uma tendência para a diminuição da área de migração das células cancerígenas com soros colhidos em M2, após a realização de 28 semanas de exercício intervalado.

Fomos também analisar a taxa de migração das colónias para entender de migração das células, como representados na Figura 25 para o grupo de exercício aeróbio e Figuras 26 para o grupo de exercício grupo intervalado.

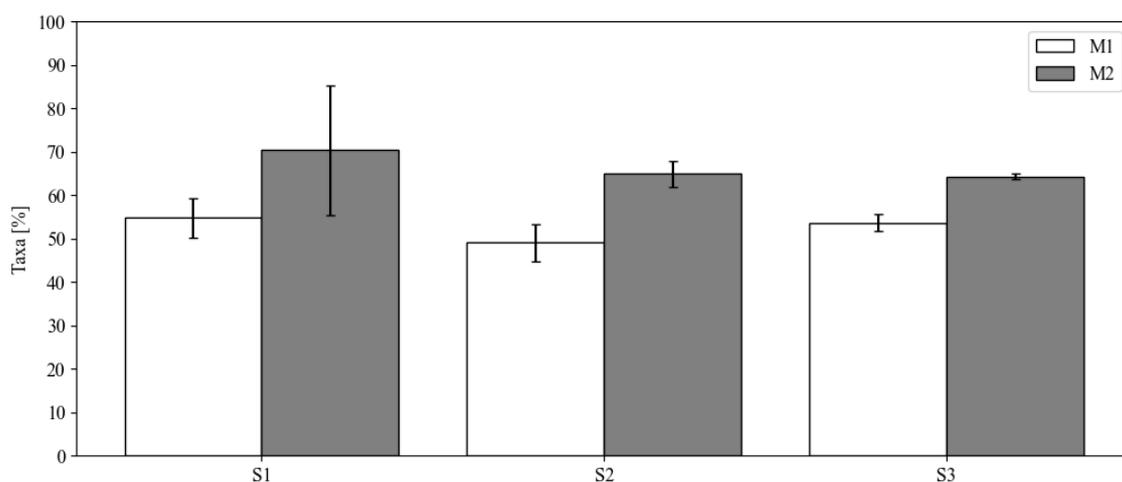


Figura 25| Taxa de migração das células A549 quando estimuladas com soro condicionado de mulher do grupo aeróbio (M1 e M2).

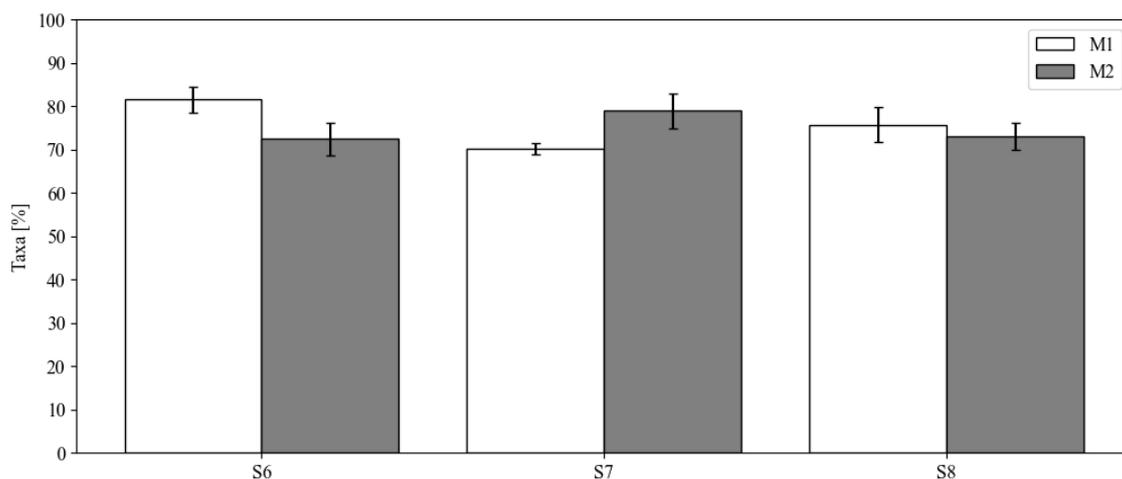


Figura 26| Taxa de migração das colónias de células A549 com soro condicionado de mulher do grupo intervalado (M1 e M2).

O objetivo foi verificar se existiram ou não diferenças estatisticamente significativas na taxa de migração das células em dois momentos diferentes (M1 e M2).

Para o grupo aeróbio (Figuras 25), o valor de sig. foi de 0.083, logo não existiu diferenças estatisticamente significativas na taxa de migração das células em dois momentos diferentes (M1 e M2).

No grupo intervalado (Figuras 26), o valor de sig. foi de 0.103, logo não existiu diferenças estatisticamente significativas na taxa de migração das células em dois momentos diferentes (M1 e M2).

Na Figura 27 é possível verificar os poços e as respectivas diferenças do ensaio ferida obtidas as 0h e 18h no M1 (B) e M2 (C) no grupo aeróbio. Também na Figura 28 é possível verificar nos poços as respectivas diferenças do ensaio ferida obtidas 0h e 18h no M1 (B) e M2 (C) para três diferentes soros condicionados pelo grupo de exercício intervalado.

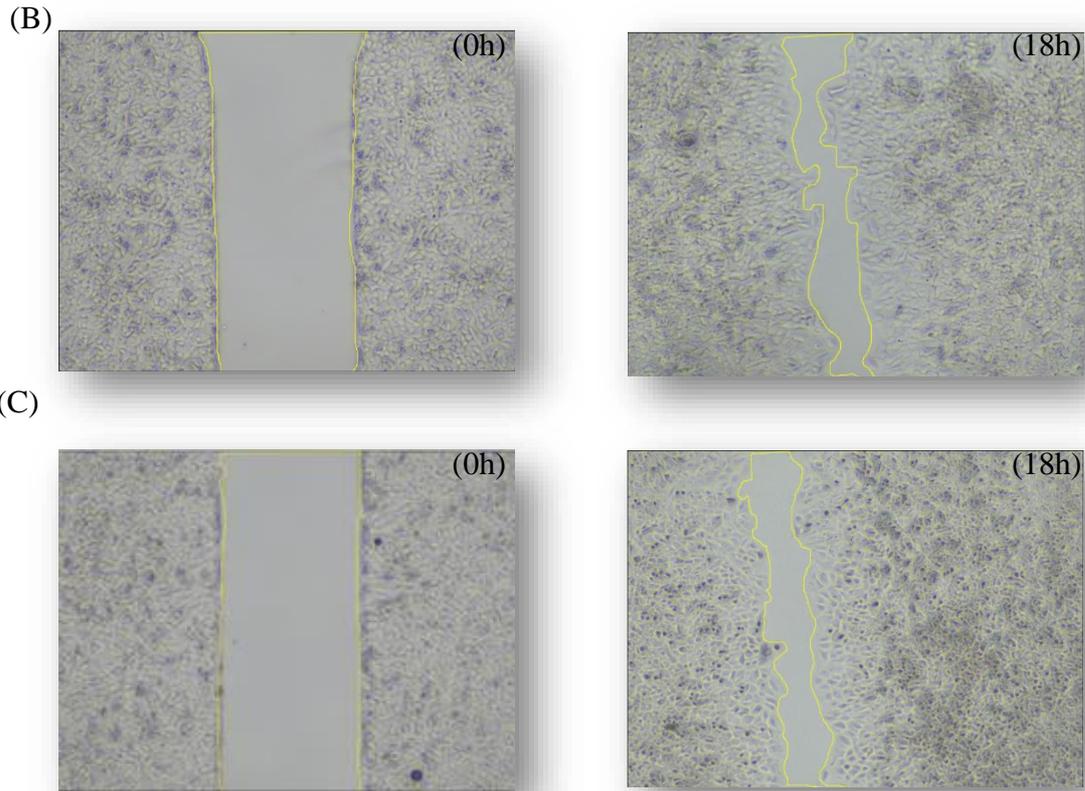


Figura 27| **Ensaio Ferida com células A549** com soro de mulher do grupo aeróbio 0h e 18h no M1 (B) e M2 (C).

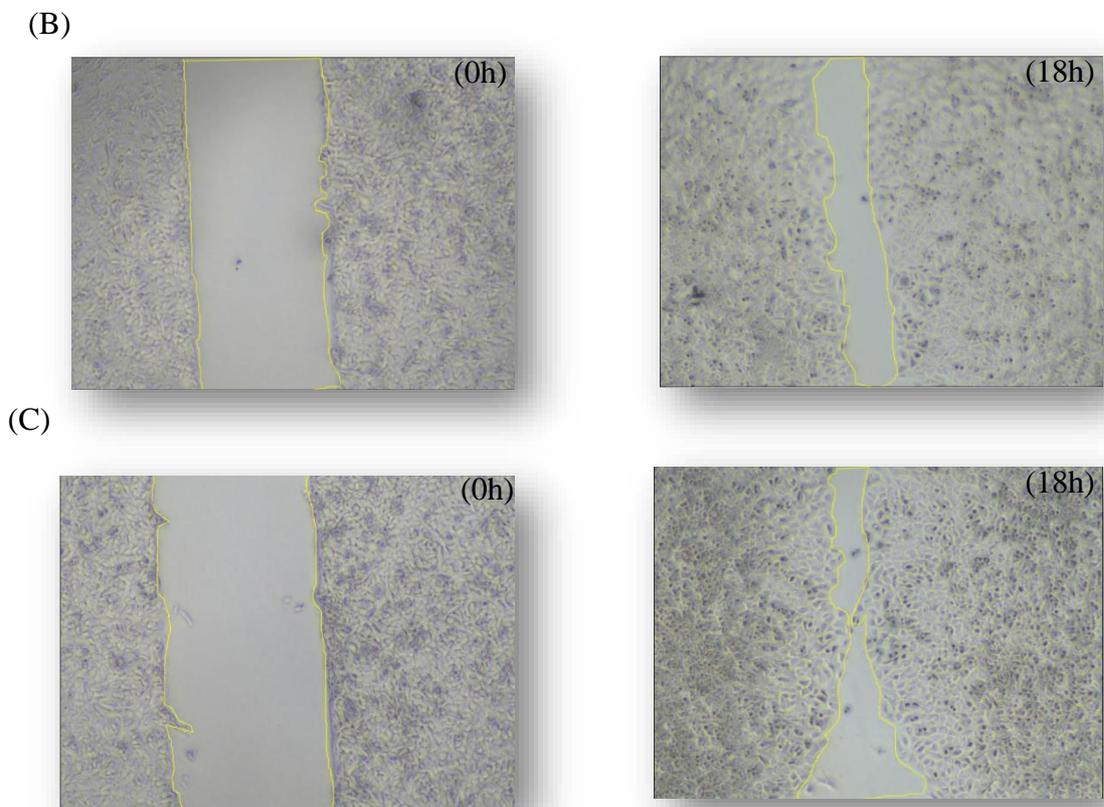


Figura 28| **Ensaio Ferida com células A549** com soro de mulher do grupo 0h e 18h no M1 (B) e M2 (C).

4. Discussão

Para o desenvolvimento do estudo foi utilizado a linha celular A549, com uma rotina celular que incluiu deixar a linha crescer em monocamada até estarem reunidas as condições de trabalho (cerca de 80% de confluência), a partir desse momento a cultura foi lavada com PBS, tripsinizada e ressuspensa em meio com 10% de FBS.

O soro humano condicionado utilizado para este estudo foi recolhido para o estudo de Carlos Farinha (160) e encontrava-se armazenado a -80°C . De salientar que todo o soro utilizado no estudo era de mulheres idosas (> 65 anos) e tinha sido recolhido em repouso antes e depois de um programa de exercício físico em meio aquático com duração de 28 semanas.

Assim, o intuito deste estudo foi avaliar o efeito do soro condicionado pelo exercício crónico na proliferação, no potencial clonogénico, na alteração metabólica e na capacidade de migração das células de cancro do pulmão A549.

No ensaio de quantificação de L-lactato avaliamos a capacidade de fermentação láctica quantificando o L-lactato presente no meio de cultura do ensaio SRB. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no efeito dos soros condicionado recolhidos antes (M1) e depois (M2) da intervenção, verificando-se, no entanto, que existiu uma tendência em todos os soros testados (exceto dois) para um maior valor nas concentrações de lactato em M2. Estes resultados sugerem que as células A549 se tornaram mais fermentativas na presença de soros no M2.

A tendência em todos os grupos foi de um aumento nas concentrações de lactato do M1 para M2, com exceção do soro S4 (grupo combinado) e do soro S8 (grupo intervalado).

Quando comparamos os grupos de intervenção com exercício com o grupo controle verificamos que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

Através do ensaio SRB, conseguimos analisar os valores de densidade celular das culturas através da medição do conteúdo proteico, verificando-se mais uma vez que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre M1 e M2. No entanto, foi possível verificar que a maioria das culturas teve um decréscimo nos níveis de densidade celular quando expostas a soros condicionados pelos programas de exercício.

Ao compararmos o grupo de intervenção com o grupo controle, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, o que pode ser justificado por um N muito reduzido (N=9 no grupo de exercício e N=2 para o grupo de controle) da amostra.

No ensaio clonogénico, foi notório uma ligeira diminuição da capacidade de formação de colónias com os soros condicionados pelo exercício (M2), contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa. Porém o soro S8 (do grupo de exercício intervalado) teve um comportamento oposto aos restantes, aumentando o número de colónias de M1 para M2.

Relativamente à área ocupada pelas colónias quando utilizados os soros do grupo aeróbio, verifica-se uma ligeira redução de M1 para M2, não ocorrendo, no entanto, de forma idêntica para todos os sujeitos, o mesmo sendo observado com a utilização dos soros do grupo intervalado.

No ensaio de migração, com imagens recolhidas às 0h e 18h, foi possível verificar um aumento da área de migração das células quanto tratadas com soro de M2 (em relação aos soros de M1) tanto para o grupo de exercício aeróbio como, para o grupo de exercício intervalado. Para a taxa de migração os resultados mostraram que no grupo aeróbio, os valores mantiveram-se entre 50 e 60% no M1 e aumentaram para 60 e 70% em M2, contudo esta tendência não estatisticamente significativas. Nos soros condicionados pelo exercício intervalado houve uma tendência para uma diminuição na taxa de migração de M1 (80 e 90%) para M2 (80 e 70%), mas mais uma vez sem significados estatísticos.

Este estudo veio abrir caminhos para novos estudos, uma vez que não existem estudos na comunidade científica estudos sobre os efeitos do soro condicionado pelo exercício crónico de mulheres idosas na transformação de linhas celulares de cancro do pulmão, designadamente: a fermentação láctica, capacidade de migração e potencial clonogénico.

Apenas foi identificado um estudo, em jovens universitários do sexo masculino realizado por Kurgan et al., com células A549 expostas a 10% de soro humano que não demonstrou ter efeitos estatisticamente significativos na sobrevivência das células, quando comparadas com as células cultivadas com 10% de FBS. Contudo, as mesmas quando expostas a 10% de soro humano recolhido cinco minutos, 1H e 24H após o exercício físico indicou taxas mais reduzidas de sobrevivência de apenas $21.5 \pm 2,9\%$,

33.9 ±3.5% e 35.8 ±6.7% respetivamente quando comparadas com o grupo de controle (100%) (166).

No mesmo estudo foram também avaliados os efeitos anticancerígenos *in vitro* e as vias de sinalização afetadas depois de exercícios agudos e de alta intensidade. Os resultados mostraram uma inibição significativa da sobrevivência e da proliferação celular das A549, a nível dos fibroblastos pulmonares não houve qualquer efeito. Mais estudos foram realizados com efeitos semelhantes noutras tipologias de cancro, nomeadamente, em células de cancro da próstata (167) e cancro da mama (168).

No estudo desenvolvido por Rundqvist et al. foi concluído que as células cancerígenas da próstata (LNCaP) tratadas com soro humano recolhido logo após uma hora de ciclismo permitiu uma inibição de 31% no crescimento das células quando comparado com o efeito do soro pré exercício (167). Em 2016, no estudo apresentado por Dethlefsen concluiu-se que o soro recolhido após duas horas de uma exercício agudo em sujeitos não treinados reduzia significativamente a viabilidade das linhas celulares do cancro da mama MCF-7 e MDA-MB-231 (168).

Embora não seja ainda claro quais são os fatores séricos que contribuem para a diminuição dos efeitos cancerígenos com a prática de exercício físico, sabe-se que a prática regular de exercício físico tem impacto a diversos níveis, nomeadamente, a nível das hormonas, dos fatores de crescimento e citocinas em circulação, do movimento de contração do músculo esquelético sendo importante uma vez que, liberta para a corrente sanguínea miocinas e outras substâncias que podem interagir com outros tecidos e resultar em benefícios para a saúde (169).

São inúmeras as respostas promovidas pelo exercício, quer seja agudo ou crónico, afetando também a resposta do sistema imunitário.

Dependendo do tipo, da intensidade, da duração do exercício e do nível de aptidão física os principais efeitos do exercício no sistema imunitário são: uma melhoria na função imunitária, ou seja, a prática regular de exercício físico com intensidade moderada permite que haja um aumento da atividade das células imunitárias, nomeadamente os neutrófilos, macrófagos e NK o que proporciona ao organismo uma melhor defesa contra agentes patogénicos (vírus e bactérias) e aumento na capacidade de deteção de células tumorais (175).

Numa revisão sistemática recente, foram analisados 10 artigos com intervenções em pacientes com cancro do pulmão. Todos eles focaram o exercício aeróbio ou combinado (exercícios aeróbio com exercícios de resistência) e foi no exercício aeróbio que se notou mais efeitos, principalmente nos sintomas de fadiga como representado na Tabela 8 (171).

Tabela 5| Efeitos das diferentes intervenções. Adaptado de Yang et al. (175).

Tipo de exercícios	Com efeitos significativos	Sem efeitos significativos
Aeróbio	(172–176)	(177,178)
Resistência		(179)
Aeróbico + Resistência		(180–186)
Aeróbico + Equilíbrio	(187–189)	
Aeróbico + Resistência + Respiração	(190)	(191,192)
Resistência + Força		(193)
HIIT + Resistência + Respiração	(194)	

A maioria dos estudos referem que a prática regular do exercício físico é visto como sendo um método seguro e eficaz para os pacientes com cancro do pulmão (195). As diretrizes aconselham aos doentes com cancro à prática de pelo menos 90 minutos por semana de exercício aeróbio a uma intensidade moderada, exercícios de resistência e flexibilidade pelo menos duas vezes por semana (133).

A investigação desenvolvida teve algumas limitações nomeadamente o reduzido universo da amostra, apenas 11 amostras de mulheres idosas (nove efetuaram programas de exercício físico e duas do grupo de controle) a insuficiente quantidade de soro condicionado pelo exercício.

5. Conclusão

A inatividade física é um dos principais fatores de risco de morte em todo o mundo, havendo também uma associação entre o aumento dos níveis de atividade física e a redução do risco de desenvolvimento de cancro. Embora seja de conhecimento geral de que a prática regular de exercício físico seja benéfica, continuam-se a observar elevadas taxas de inatividade por todo mundo.

Os problemas de obesidade, excesso de peso, inatividade e tabagismo representam os pilares para a possibilidade de desenvolvimento do cancro.

Contudo, prevenir o aparecimento do cancro passa pela noção de que é fundamental ter um equilíbrio energético, ou seja, com uma redução da inatividade física e com alterações na dieta é possível reduzir os riscos de cancro.

Um estilo de vida ativo e saudável torna-se um fator importante que acarreta melhorias na saúde física, mental e no bem-estar. Ser ativo traz benefícios que são independentes de múltiplos fatores, nomeadamente da idade, do sexo, da raça, da etnia e do nível de aptidão física.

A realização desta dissertação permitiu realizar um estudo piloto para avaliar se a realização de exercício crónico poderia afetar a capacidade proliferativa de uma linha celular de cancro do pulmão quando cultivada com meio de cultura enriquecido com soro humano condicionado pelo exercício. Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre soros colhidos no início e no final das intervenções com exercício verificaram-se tendências que podem ser clinicamente relevantes nomeadamente uma diminuição na proliferação da linha celular cancerígenas e uma redução na capacidade de formação de colónias.

Em face dos resultados obtidos, torna-se então relevante fazer mais estudos, com uma amostra superior, para consolidar o conhecimento sobre o efeito direto de diferentes programas de exercício físico sobre as células de cancro. A evolução do conhecimento nesta área permitirá no futuro uma prescrição de exercício físico mais adequada às diferentes fases do cancro.

6. Referências

1. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*. 22 de janeiro de 2019;85(1):8.
2. Balata H, Evison M, Sharman A, Crosbie P, Booton R. CT screening for lung cancer: Are we ready to implement in Europe? *Lung Cancer*. agosto de 2019;134:25–33.
3. Yousaf U. The NELSON Lung Cancer Screening Trial: Final screening round and follow-up. Erasmus Universiteit Rotterdam (EUR); 2018.
4. Snowsill T, Yang H, Griffin E, Long L, Varley-Campbell J, Coelho H, et al. Low-dose computed tomography for lung cancer screening in high-risk populations: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. novembro de 2018;22(69):1–276.
5. Guerreiro T, Forjaz G, Antunes L, Bastos J, Mayer A, Aguiar P, et al. Lung cancer survival and sex-specific patterns in Portugal: A population-based analysis. *Pulmonology*. outubro de 2021;S2531043721001902.
6. Wynder EL. Tobacco Smoking as a Possible Etiologic Factor in Bronchiogenic Carcinoma: A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases. *JAMA*. 24 de maio de 1985;253(20):2986.
7. Wynder EL. TOBACCO SMOKING AS A POSSIBLE ETIOLOGIC FACTOR IN BRONCHIOGENIC CARCINOMA: A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases. *J Am Med Assoc*. 27 de maio de 1950;143(4):329.
8. Bach PB. Smoking as a Factor in Causing Lung Cancer. *JAMA*. 4 de fevereiro de 2009;301(5):539.
9. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel KH, Johnen G, Pohlabein H, et al. Cigarette smoking and lung cancer-relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 1 de setembro de 2012;131(5):1210–9.
10. Villeneuve PJ, Mao Y. Lifetime probability of developing lung cancer, by smoking status, Canada. *Can J Public Health Rev Can Sante Publique*. 1994;85(6):385–8.
11. Jemal A. Trends in the Leading Causes of Death in the United States, 1970-2002. *JAMA*. 14 de setembro de 2005;294(10):1255.
12. Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, et al. A Risk Model for Prediction of Lung Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2 de maio de 2007;99(9):715–26.

13. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. outubro de 2005;93(7):825–33.
14. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. Myer L, editor. *PLoS ONE*. 31 de março de 2011;6(3):e17479.
15. Yu YH, Liao CC, Hsu WH, Chen HJ, Liao WC, Muo CH, et al. Increased Lung Cancer Risk among Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Population Cohort Study. *J Thorac Oncol*. janeiro de 2011;6(1):32–7.
16. Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J*. 1 de agosto de 2009;34(2):380–6.
17. Besaratinia A, Pfeifer GP. Second-hand smoke and human lung cancer. *Lancet Oncol*. julho de 2008;9(7):657–66.
18. Brennan P, Buffler PA, Reynolds P, Wu AH, Wichmann HE, Agudo A, et al. Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: A pooled analysis of two large studies: Secondhand Smoke and Lung Cancer. *Int J Cancer*. 10 de março de 2004;109(1):125–31.
19. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group, Villeneuve PJ, Parent MÉ, Harris SA, Johnson KC. Occupational exposure to asbestos and lung cancer in men: evidence from a population-based case-control study in eight Canadian provinces. *BMC Cancer*. dezembro de 2012;12(1):595.
20. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 29 de janeiro de 2005;330(7485):223.
21. Kligerman S, White C. Epidemiology of Lung Cancer in Women: Risk Factors, Survival, and Screening. *Am J Roentgenol*. fevereiro de 2011;196(2):287–95.
22. Lorigan P, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *Lancet Oncol*. outubro de 2005;6(10):773–9.
23. Kirova YM, Gambotti L, De Rycke Y, Vilcoq JR, Asselain B, Fourquet A. Risk of Second Malignancies After Adjuvant Radiotherapy for Breast Cancer: A Large-Scale, Single-Institution Review. *Int J Radiat Oncol*. junho de 2007;68(2):359–63.
24. Kriehoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. Cancer – an overview. *Med Monatsschr Pharm*. fevereiro de 2017;40(2):48–54.
25. Omran AR. The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change: *The Epidemiologic Transition*. *Milbank Q*. dezembro de 2005;83(4):731–57.

26. Gersten O, Wilmoth JR. The Cancer Transition in Japan since 1951. *Demogr Res.* 6 de agosto de 2002;7:271–306.
27. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. Em: Ahmad A, Gadgeel S, editores. *Lung Cancer and Personalized Medicine* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 4 de janeiro de 2023]. p. 1–19. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 893). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24223-1_1
28. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* novembro de 2018;68(6):394–424.
29. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* maio de 2021;71(3):209–49.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* março de 2011;144(5):646–74.
31. Rando TA. The Ins and Outs of Aging and Longevity. *Annu Rev Physiol.* 10 de fevereiro de 2013;75(1):617–9.
32. Smith BD, Smith GL, Hurria A, Hortobagyi GN, Buchholz TA. Future of Cancer Incidence in the United States: Burdens Upon an Aging, Changing Nation. *J Clin Oncol.* 10 de junho de 2009;27(17):2758–65.
33. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci.* novembro de 1981;78(11):7124–8.
34. Bernhard D, Moser C, Backovic A, Wick G. Cigarette smoke – an aging accelerator? *Exp Gerontol.* março de 2007;42(3):160–5.
35. Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, Pennington JY, Schoenhofen EA, Andersen SL, et al. Lower All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality in Centenarians’ Offspring: LOWER MORTALITY IN CENTENARIANS’ OFFSPRING. *J Am Geriatr Soc.* dezembro de 2004;52(12):2074–6.
36. Mederos N, Friedlaender A, Peters S, Addeo A. Gender-specific aspects of epidemiology, molecular genetics and outcome: lung cancer. *ESMO Open.* 2020;5:e000796.
37. Pavlidis N, Stanta G, Audisio RA. Cancer prevalence and mortality in centenarians: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* julho de 2012;83(1):145–52.
38. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Jane Henley S. Age and Cancer Risk. *Am J Prev Med.* março de 2014;46(3):S7–15.

39. Travis WD. Pathology of Lung Cancer. *Clin Chest Med.* dezembro de 2011;32(4):669–92.
40. Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med.* 13 de agosto de 2020;383(7):640–9.
41. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 1 de julho de 2009;59(4):225–49.
42. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, et al. Smoking Prevalence and Cigarette Consumption in 187 Countries, 1980-2012. *JAMA.* 8 de janeiro de 2014;311(2):183.
43. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* janeiro de 2019;69(1):7–34.
44. Cigarette Smoking Among Successive Birth Cohorts of Men and Women in the United States During 1900–1980. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet].* setembro de 1983 [citado 10 de janeiro de 2023]; Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/71.3.473>
45. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* fevereiro de 2011;6(2):244–85.
46. Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2013. *J Natl Compr Canc Netw.* junho de 2013;11(6):645–53.
47. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, Guérin E, Meyer N, Ducrocq X, et al. Allelic imbalance at loci containing FGFR, FGF, c-Met and HGF candidate genes in non-small cell lung cancer sub-types, implication for progression. *Eur J Cancer.* novembro de 2003;39(17):2538–47.
48. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin Proc.* maio de 2008;83(5):584–94.
49. Neville A. Lung cancer. *Clin Evid.* dezembro de 2005;(14):1903–20.
50. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* dezembro de 2015;1856(2):189–210.
51. Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM. Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer. *Mol Cancer Res.* 1 de janeiro de 2014;12(1):3–13.

52. Huang R, Wei Y, Hung RJ, Liu G, Su L, Zhang R, et al. Associated Links Among Smoking, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Small Cell Lung Cancer: A Pooled Analysis in the International Lung Cancer Consortium. *EBioMedicine*. novembro de 2015;2(11):1677–85.
53. Varghese AM, Zakowski MF, Yu HA, Won HH, Riely GJ, Krug LM, et al. Small-Cell Lung Cancers in Patients Who Never Smoked Cigarettes. *J Thorac Oncol*. junho de 2014;9(6):892–6.
54. Lamichhane DK, Kim HC, Choi CM, Shin MH, Shim YM, Leem JH, et al. Lung Cancer Risk and Residential Exposure to Air Pollution: A Korean Population-Based Case-Control Study. *Yonsei Med J*. 2017;58(6):1111.
55. Rodríguez-Martínez Á, Torres-Durán M, Barros-Dios JM, Ruano-Ravina A. Residential radon and small cell lung cancer. A systematic review. *Cancer Lett*. julho de 2018;426:57–62.
56. Wang J, Liu Q, Yuan S, Xie W, Liu Y, Xiang Y, et al. Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies. *Sci Rep*. 21 de agosto de 2017;7(1):8371.
57. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 14 de janeiro de 2021;7(1):3.
58. Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *The Lancet*. outubro de 2005;366(9494):1385–96.
59. Rodriguez E, Lilenbaum RC. Small Cell Lung Cancer: Past, Present, and Future. *Curr Oncol Rep*. setembro de 2010;12(5):327–34.
60. Kazarian M, Laird-Offringa IA. Small-cell lung cancer-associated autoantibodies: potential applications to cancer diagnosis, early detection, and therapy. *Mol Cancer*. 2011;10(1):33.
61. Zhang Y, Yang D, Weng L, Wang L. Early Lung Cancer Diagnosis by Biosensors. *Int J Mol Sci*. 25 de julho de 2013;14(8):15479–509.
62. Malina RM, Katzmarzyk PT. Physical Activity and Fitness in an International Growth Standard for Preadolescent and Adolescent Children. *Food Nutr Bull*. dezembro de 2006;27(4_suppl5):S295–313.
63. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*. 1985;100(2):126–31.
64. OECD, World Health Organization. Step Up! Tackling the Burden of Insufficient Physical Activity in Europe [Internet]. OECD; 2023 [citado 3 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration->

health/step-up-tackling-the-burden-of-insufficient-physical-activity-in-europe_500a9601-en

65. Arem H, Moore SC, Patel A, Hartge P, Berrington de Gonzalez A, Visvanathan K, et al. Leisure Time Physical Activity and Mortality: A Detailed Pooled Analysis of the Dose-Response Relationship. *JAMA Intern Med.* 1 de junho de 2015;175(6):959.
66. 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.
67. King A. 2018 Physical Activity Guidelines Advisory Committee Scientific Report. Em: 2018 Physical Activity Guidelines Advisory Committee Scientific Report.
68. Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The Lancet.* julho de 2012;380(9838):219–29.
69. Rhodes RE, Janssen I, Bredin SSD, Warburton DER, Bauman A. Physical activity: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychol Health.* 3 de agosto de 2017;32(8):942–75.
70. Van Der Ploeg HP, Bull FC. Invest in physical activity to protect and promote health: the 2020 WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Int J Behav Nutr Phys Act.* dezembro de 2020;17(1):145, s12966-020-01051–1.
71. Kwon S, Janz KF, Letuchy EM, Burns TL, Levy SM. Active lifestyle in childhood and adolescence prevents obesity development in young adulthood: Active Lifestyle Prevents Obesity Development. *Obesity.* dezembro de 2015;23(12):2462–9.
72. World Health Organization. Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [citado 9 de maio de 2023]. 101 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272722>
73. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet Lond Engl.* 19 de novembro de 2005;366(9499):1784–93.
74. Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet Lond Engl.* 1 de outubro de 2005;366(9492):1197–209.
75. Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer.* 2011;186:13–42.

76. Schmitz K. Physical activity and breast cancer survivorship. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer*. 2011;186:189–215.
77. Bouchard C. Physical activity and health: introduction to the dose-response symposium. *Med Sci Sports Exerc*. junho de 2001;33(6 Suppl):S347-350.
78. Albanes D, Blair A, Taylor PR. Physical activity and risk of cancer in the NHANES I population. *Am J Public Health*. junho de 1989;79(6):744–50.
79. Kubík A, Zatloukal P, Tomásek L, Pauk N, Petruzelka L, Plesko I. Lung cancer risk among nonsmoking women in relation to diet and physical activity. *Neoplasma*. 2004;51(2):136–43.
80. Lee IM, Sesso HD, Paffenbarger RS. Physical activity and risk of lung cancer. *Int J Epidemiol*. agosto de 1999;28(4):620–5.
81. Lee SY, Kim MT, Jee SH, Im JS. Does hypertension increase mortality risk from lung cancer? A prospective cohort study on smoking, hypertension and lung cancer risk among Korean men. *J Hypertens*. abril de 2002;20(4):617–22.
82. Leitzmann MF, Koebnick C, Abnet CC, Freedman ND, Park Y, Hollenbeck A, et al. Prospective study of physical activity and lung cancer by histologic type in current, former, and never smokers. *Am J Epidemiol*. 1 de março de 2009;169(5):542–53.
83. Mao Y, Pan S, Wen SW, Johnson KC, Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Physical activity and the risk of lung cancer in Canada. *Am J Epidemiol*. 15 de setembro de 2003;158(6):564–75.
84. Severson RK, Nomura AM, Grove JS, Stemmermann GN. A prospective analysis of physical activity and cancer. *Am J Epidemiol*. setembro de 1989;130(3):522–9.
85. Sinner P, Folsom AR, Harnack L, Eberly LE, Schmitz KH. The association of physical activity with lung cancer incidence in a cohort of older women: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. dezembro de 2006;15(12):2359–63.
86. Sprague BL, Trentham-Dietz A, Klein BEK, Klein R, Cruickshanks KJ, Lee KE, et al. Physical activity, white blood cell count, and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. outubro de 2008;17(10):2714–22.
87. Thune I, Lund E. The influence of physical activity on lung-cancer risk: A prospective study of 81,516 men and women. *Int J Cancer*. 6 de janeiro de 1997;70(1):57–62.

88. Yun YH, Lim MK, Won YJ, Park SM, Chang YJ, Oh SW, et al. Dietary preference, physical activity, and cancer risk in men: national health insurance corporation study. *BMC Cancer*. dezembro de 2008;8(1):366.
89. Bak H, Christensen J, Thomsen BL, Tjønneland A, Overvad K, Loft S, et al. Physical activity and risk for lung cancer in a Danish cohort. *Int J Cancer*. 1 de setembro de 2005;116(3):439–44.
90. Colbert LH, Hartman TJ, Tangrea JA, Pietinen P, Virtamo J, Taylor PR, et al. Physical activity and lung cancer risk in male smokers. *Int J Cancer*. 10 de abril de 2002;98(5):770–3.
91. Dosemeci M, Hayes RB, Vetter R, Hoover RN, Tucker M, Engin K, et al. Occupational physical activity, socioeconomic status, and risks of 15 cancer sites in Turkey. *Cancer Causes Control CCC*. julho de 1993;4(4):313–21.
92. Inoue M, Yamamoto S, Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S, et al. Daily total physical activity level and total cancer risk in men and women: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Am J Epidemiol*. 15 de agosto de 2008;168(4):391–403.
93. Schnohr P, Grønbaek M, Petersen L, Hein HO, Sørensen TIA. Physical activity in leisure-time and risk of cancer: 14-year follow-up of 28,000 Danish men and women. *Scand J Public Health*. 2005;33(4):244–9.
94. Steenland K, Nowlin S, Palu S. Cancer incidence in the National Health and Nutrition Survey I. Follow-up data: diabetes, cholesterol, pulse and physical activity. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. dezembro de 1995;4(8):807–11.
95. Steindorf K, Friedenreich C, Linseisen J, Rohrmann S, Rundle A, Veglia F, et al. Physical activity and lung cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort. *Int J Cancer*. 15 de novembro de 2006;119(10):2389–97.
96. Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. Physical activity and risk of cancer in middle-aged men. *Br J Cancer*. 2 de novembro de 2001;85(9):1311–6.
97. Emaus A, Thune I. Physical activity and lung cancer prevention. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer*. 2011;186:101–33.
98. Cheng YJ, Macera CA, Addy CL, Sy FS, Wieland D, Blair SN. Effects of physical activity on exercise tests and respiratory function. *Br J Sports Med*. dezembro de 2003;37(6):521–8.
99. Vainio H, International Agency for Research on Cancer, editores. Weight control and physical activity: IARC Working Group on the Evaluation on Cancer-Preventive Strategies which met in Lyon, France, February 13 - 20, 2001. Lyon:

- International Agency for Research on Cancer; 2002. 315 p. (IARC handbooks of cancer prevention).
100. Fairey AS, Courneya KS, Field CJ, Bell GJ, Jones LW, Mackey JR. Randomized controlled trial of exercise and blood immune function in postmenopausal breast cancer survivors. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. abril de 2005;98(4):1534–40.
 101. Jakóbiśiak M, Lasek W, Gołab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett*. 15 de dezembro de 2003;90(2–3):103–22.
 102. Engels EA. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert Rev Anticancer Ther*. abril de 2008;8(4):605–15.
 103. Ballaz S, Mulshine JL. The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis. *Clin Lung Cancer*. julho de 2003;5(1):46–62.
 104. Cheville AL, Kollasch J, Vandenberg J, Shen T, Grothey A, Gamble G, et al. A home-based exercise program to improve function, fatigue, and sleep quality in patients with Stage IV lung and colorectal cancer: a randomized controlled trial. *J Pain Symptom Manage*. maio de 2013;45(5):811–21.
 105. Michaels C. The importance of exercise in lung cancer treatment. *Transl Lung Cancer Res*. junho de 2016;5(3):235–8.
 106. Avancini A, Sartori G, Gkountakos A, Casali M, Trestini I, Tregnago D, et al. Physical Activity and Exercise in Lung Cancer Care: Will Promises Be Fulfilled? *The Oncologist*. março de 2020;25(3):e555–69.
 107. Wang D, Cheng J, Zhang J, Zhou F, He X, Shi Y, et al. The Role of Respiratory Microbiota in Lung Cancer. *Int J Biol Sci*. 2021;17(13):3646–58.
 108. Chevalier LL, Blackmon JE, Roman A, Chang G, Recklitis CJ. Screening young adult cancer survivors for depression and anxiety with the Primary Care Evaluation of Mental Disorders (PRIME-MD): Comparisons with a structured clinical diagnostic interview. *Psychooncology* [Internet]. [citado 6 de junho de 2023];n/a(n/a). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pon.6166>
 109. de Magalhães JP. How ageing processes influence cancer. *Nat Rev Cancer*. maio de 2013;13(5):357–65.
 110. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*. 17 de maio de 2001;411(6835):390–5.
 111. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 1 de fevereiro de 2010;116(3):544–73.

112. Stuart-Hamilton I, editor. An introduction to gerontology. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2011.
113. Deeks SG. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu Rev Med*. 18 de fevereiro de 2011;62(1):141–55.
114. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol*. 10 de fevereiro de 2013;75(1):685–705.
115. Ott JJ, Ullrich A, Mascarenhas M, Stevens GA. Global cancer incidence and mortality caused by behavior and infection. *J Public Health*. junho de 2011;33(2):223–33.
116. Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation. *Prev Med*. maio de 2012;54:S29–37.
117. Braithwaite D, Anton S, Mohile S, DeGregori J, Gillis N, Zhou D, et al. Cancer and aging: A call to action. *Aging Cancer*. junho de 2022;3(2):87–94.
118. Suchard M. Immunosenescence: Ageing of the immune system. 1 de janeiro de 2015;82:28–31.
119. Müller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun*. julho de 2014;39:8–22.
120. Bohn-Goldbaum E, Owen KB, Lee VYJ, Booy R, Edwards KM. Physical activity and acute exercise benefit influenza vaccination response: A systematic review with individual participant data meta-analysis. Abdelbasset WK, editor. *PLOS ONE*. 15 de junho de 2022;17(6):e0268625.
121. Silva LCR, de Araújo AL, Fernandes JR, Matias M de ST, Silva PR, Duarte AJS, et al. Moderate and intense exercise lifestyles attenuate the effects of aging on telomere length and the survival and composition of T cell subpopulations. *Age Dordr Neth*. fevereiro de 2016;38(1):24.
122. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. janeiro de 2022;12(1):31–46.
123. Xavier R do N, Xavier MN, Silva DMF da, Reis JM do N, Damasceno V de O, Santos Costa A dos. Efeito de três programas de atividade física sobre o equilíbrio, autonomia funcional e risco de quedas em idosos. *Rev Port Ciênc Desporto*. 2014;2014:968–77.
124. Miura H, Takahashi Y, Maki Y, Sugino M. Effects of exercise training on arterial stiffness in older hypertensive females. *Eur J Appl Physiol*. 1 de setembro de 2015;115(9):1847–54.
125. Ryan AS. Exercise in aging: its important role in mortality, obesity and insulin resistance. *Aging Health*. outubro de 2010;6(5):551–63.

126. Nakamura Y, Tanaka K, Yabushita N, Sakai T, Shigematsu R. Effects of exercise frequency on functional fitness in older adult women. *Arch Gerontol Geriatr.* 2007;44(2):163–73.
127. American College of Sports Medicine. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. 9. ed. Pescatello LS, editor. Baltimore, Md.: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 456 p.
128. Adamsen L, Stage M, Laursen J, Rørth M, Quist M. Exercise and relaxation intervention for patients with advanced lung cancer: a qualitative feasibility study. *Scand J Med Sci Sports.* dezembro de 2012;22(6):804–15.
129. Zaleski AL, Taylor BA, Panza GA, Wu Y, Pescatello LS, Thompson PD, et al. Coming of Age: Considerations in the Prescription of Exercise for Older Adults. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2016;12(2):98–104.
130. Lee PG, Jackson EA, Richardson CR. Exercise Prescriptions in Older Adults. *Am Fam Physician.* 1 de abril de 2017;95(7):425–32.
131. Mustian KM, Cole CL, Lin PJ, Asare M, Fung C, Janelins MC, et al. Exercise Recommendations for the Management of Symptoms Clusters Resulting From Cancer and Cancer Treatments. *Semin Oncol Nurs.* novembro de 2016;32(4):383–93.
132. Hayes SC, Newton RU, Spence RR, Galvão DA. The Exercise and Sports Science Australia position statement: Exercise medicine in cancer management. *J Sci Med Sport.* novembro de 2019;22(11):1175–99.
133. Capozzi LC, Daun JT, Ester M, Mosca S, Langelier D, Francis GJ, et al. Physical Activity for Individuals Living with Advanced Cancer: Evidence and Recommendations. *Semin Oncol Nurs.* agosto de 2021;37(4):151170.
134. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors². *JNCI J Natl Cancer Inst.* novembro de 1973;51(5):1417–23.
135. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Exp Cell Res.* setembro de 1998;243(2):359–66.
136. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* 6th ed. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell; 2010. 732 p.
137. Docslib [Internet]. [citado 6 de junho de 2023]. *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook.* Disponível em: <https://docslib.org/doc/9611633/fundamental-techniques-in-cell-culture-laboratory-handbook>
138. *New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs | Transfusion Medicine and Hemotherapy | Karger Publishers* [Internet]. [citado 6 de junho de 2023]. Disponível em:

<https://karger.com/tmh/article/46/3/197/301551/New-Approaches-to-Cryopreservation-of-Cells>

139. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols | SpringerLink [Internet]. [citado 6 de junho de 2023]. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1385/1592594069>
140. Animal Cell Culture | SpringerLink [Internet]. [citado 6 de junho de 2023]. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-10320-4>
141. Harrison MA. Cryopreservation of Cells. Em: Encyclopedia of Life Sciences [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2001 [citado 6 de junho de 2023]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/npg.els.0002561>
142. Tan K. Current protocols in immunology. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek David H. Margulies, Ethan M. Shevach and Warren Strober (eds). John Wiley and Sons: New York US\$240 (loose-leaf binder) (1991). Cell Biochem Funct. 1991;9(4):295–295.
143. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Em: Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, editores. Current Protocols in Immunology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001 [citado 9 de junho de 2023]. p. ima03bs21. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.ima03bs21>
144. Parimelazhagan T. Pharmacological assays of plant-based natural products. Switzerland: Springer; 2016. 188 p. (Progress in drug research).
145. Sola-Leyva A, Jabalera Y, Chico-Lozano MA, Carrasco-Jiménez MP, Iglesias GR, Jimenez-Lopez C. Reactive oxygen species (ROS) production in HepG2 cancer cell line through the application of localized alternating magnetic field. J Mater Chem B. 2020;8(34):7667–76.
146. Gomathi AC, Xavier Rajarathinam SR, Mohammed Sadiq A, Rajeshkumar S. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of Tamarindus indica on MCF-7 human breast cancer cell line. J Drug Deliv Sci Technol. fevereiro de 2020;55:101376.
147. Omaiye EE, McWhirter KJ, Luo W, Tierney PA, Pankow JF, Talbot P. High concentrations of flavor chemicals are present in electronic cigarette refill fluids. Sci Rep. 21 de fevereiro de 2019;9(1):2468.
148. Nga NTH, Ngoc TTB, Trinh NTM, Thuoc TL, Thao DTP. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. Anal Biochem. dezembro de 2020;610:113937.
149. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. Em: Larramendy ML, Soloneski S, editores. Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World [Internet]. InTech; 2018 [citado 8 de junho de 2023]. Disponível em:

<http://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>

150. (PDF) ENSAIOS COLORIMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE IN VITRO. Em: ResearchGate [Internet]. [citado 8 de junho de 2023]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/357142227_ENSAIOS_COLORIMETRICOS_PARA_DETERMINACAO_DA_VIABILIDADE_CELULAR_E_CITOTOXICIDADE_IN_VITRO
151. Parhamifar L, Andersen H, Moghimi SM. Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. Em: Ogris M, Oupicky D, editores. Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [citado 13 de junho de 2023]. p. 13–22. (Methods in Molecular Biology; vol. 948). Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-140-0_2
152. studylib.es [Internet]. [citado 8 de junho de 2023]. Técnicas RANDOX. Disponível em: <https://studylib.es/doc/7615280/técnicas-randox>
153. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 4 de julho de 1990;82(13):1107–12.
154. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* agosto de 2006;1(3):1112–6.
155. Maley AM, Arbiser JL. Gentian Violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Exp Dermatol.* dezembro de 2013;22(12):775–80.
156. Coico R. Gram staining. *Curr Protoc Microbiol.* outubro de 2005;Appendix 3:Appendix 3C.
157. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 1 de abril de 2016;2016(4):pdb.prot087379.
158. Saotome K, Morita H, Umeda M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 1989;3(4):317–21.
159. Freitas JT, Jozic I, Bedogni B. Wound Healing Assay for Melanoma Cell Migration. Em: Hargadon KM, editor. Melanoma [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [citado 9 de junho de 2023]. p. 65–71. (Methods in Molecular Biology; vol. 2265). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1205-7_4
160. Farinha C, Ferreira JP, Serrano J, Santos H, Oliveiros B, Silva FM, et al. The impact of aquatic exercise programs on the systemic hematological and inflammatory

- markers of community dwelling elderly: A randomized controlled trial. *Front Physiol.* :15.
161. Declaração de Helsínquia – Princípios Éticos na Investigação Médica envolvendo seres humanos – versão actualizada – Outubro 2013 — Direito da Medicina [Internet]. [citado 8 de julho de 2023]. Disponível em: <https://direitodamedicina.sanchoeassociados.com/arquivo/declaracao-de-helsinquia-principios-eticos-na-investigacao-medica-envolvendo-seres-humanos-versao-actualizada-outubro-2013/>
 162. Rynders CA, Blanc S, DeJong N, Bessesen DH, Bergouignan A. Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility. *J Physiol.* 15 de abril de 2018;596(8):1319–30.
 163. Pescatello LS. Diretrizes do ACSM: para os testes de esforço e sua prescrição (9a. ed). Grupo Gen - Guanabara Koogan; 2000.
 164. Karvonen MJ, Kentala E, Mustala O. The effects of training on heart rate; a longitudinal study. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1957;35(3):307–15.
 165. Franklin BA, Balady GJ, American College of Sports Medicine, editores. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. 368 p.
 166. Kurgan N, Tsakiridis E, Kouveliotti R, Moore J, Klentrou P, Tsiani E. Inhibition of Human Lung Cancer Cell Proliferation and Survival by Post-Exercise Serum Is Associated with the Inhibition of Akt, mTOR, p70 S6K, and Erk1/2. *Cancers.* 8 de maio de 2017;9(12):46.
 167. 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.
 168. Dethlefsen C, Lillielund 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.
 169. Whitham M, Febbraio MA. The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications. *Nat Rev Drug Discov.* outubro de 2016;15(10):719–29.
 170. da Silveira MP, da Silva Fagundes KK, Bizuti MR, Starck É, Rossi RC, de Resende e Silva DT. Physical exercise as a tool to help the immune system against COVID-19: an integrative review of the current literature. *Clin Exp Med.* fevereiro de 2021;21(1):15–28.
 171. Hou W, Zhai L, Yang Y, Gu S, Li C, Yang Y, et al. Is physical activity effective against cancer-related fatigue in lung cancer patients? An umbrella review of

- systematic reviews and meta-analyses. *Support Care Cancer*. março de 2023;31(3):161.
172. Jones LW, Eves ND, Peterson BL, Garst J, Crawford J, West MJ, et al. Safety and feasibility of aerobic training on cardiopulmonary function and quality of life in postsurgical nonsmall cell lung cancer patients: a pilot study. *Cancer*. 15 de dezembro de 2008;113(12):3430–9.
173. Riesenbergh H, Lübke AS. In-patient rehabilitation of lung cancer patients—a prospective study. *Support Care Cancer*. julho de 2010;18(7):877–82.
174. Andersen AH, Vinther A, Poulsen LL, Mellempgaard A. A modified exercise protocol may promote continuance of exercise after the intervention in lung cancer patients—a pragmatic uncontrolled trial. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. agosto de 2013;21(8):2247–53.
175. Hwang CL, Yu CJ, Shih JY, Yang PC, Wu YT. Effects of exercise training on exercise capacity in patients with non-small cell lung cancer receiving targeted therapy. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. dezembro de 2012;20(12):3169–77.
176. Egegaard T, Rohold J, Lillelund C, Persson G, Quist M. Pre-radiotherapy daily exercise training in non-small cell lung cancer: A feasibility study. *Rep Pract Oncol Radiother*. julho de 2019;24(4):375–82.
177. Peddle CJ, Jones LW, Eves ND, Reiman T, Sellar CM, Winton T, et al. Effects of Presurgical Exercise Training on Quality of Life in Patients Undergoing Lung Resection for Suspected Malignancy: A Pilot Study. *Cancer Nurs*. março de 2009;32(2):158–65.
178. Dhillon HM, Bell ML, van der Ploeg HP, Turner JD, Kabourakis M, Spencer L, et al. Impact of physical activity on fatigue and quality of life in people with advanced lung cancer: a randomized controlled trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 de agosto de 2017;28(8):1889–97.
179. Peddle-McIntyre CJ, Baker MK, Lee YCG, Galvão DA, Cormie P, Graham V, et al. The feasibility of a pragmatic distance-based intervention to increase physical activity in lung cancer survivors. *Eur J Cancer Care (Engl)*. janeiro de 2018;27(1).
180. Temel JS, Greer JA, Goldberg S, Vogel PD, Sullivan M, Pirl WF, et al. A structured exercise program for patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. maio de 2009;4(5):595–601.
181. Spruit MA, Janssen PP, Willemsen SCP, Hochstenbag MMH, Wouters EFM. Exercise capacity before and after an 8-week multidisciplinary inpatient rehabilitation program in lung cancer patients: a pilot study. *Lung Cancer Amst Neth*. maio de 2006;52(2):257–60.
182. Quist M, Rørth M, Langer S, Jones LW, Laursen JH, Pappot H, et al. Safety and feasibility of a combined exercise intervention for inoperable lung cancer patients

- undergoing chemotherapy: A pilot study. *Lung Cancer*. fevereiro de 2012;75(2):203–8.
183. Coats V, Maltais F, Simard S, Fréchette É, Tremblay L, Ribeiro F, et al. Feasibility and Effectiveness of a Home-Based Exercise Training Program Before Lung Resection Surgery. *Can Respir J*. 2013;20(2):e10–6.
184. Salhi B, Haenebalcke C, Perez-Bogerd S, Nguyen MD, Ninane V, Malfait TLA, et al. Rehabilitation in patients with radically treated respiratory cancer: A randomised controlled trial comparing two training modalities. *Lung Cancer Amst Neth*. agosto de 2015;89(2):167–74.
185. Cavalheri V, Jenkins S, Cecins N, Gain K, Phillips MJ, Sanders LH, et al. Exercise training for people following curative intent treatment for non-small cell lung cancer: a randomized controlled trial. *Braz J Phys Ther*. 2017;21(1):58–68.
186. Granger CL, Chao C, McDonald CF, Berney S, Denehy L. Safety and feasibility of an exercise intervention for patients following lung resection: a pilot randomized controlled trial. *Integr Cancer Ther*. maio de 2013;12(3):213–24.
187. Hoffman AJ, Brintnall RA, Brown JK, von Eye A, Jones LW, Alderink G, et al. Too Sick Not to Exercise: Using a 6-Week, Home-Based Exercise Intervention for Cancer-Related Fatigue Self-management for Postsurgical Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Nurs*. maio de 2013;36(3):175–88.
188. Hoffman AJ, Brintnall RA, Brown JK, von Eye A, Jones LW, Alderink G, et al. Virtual Reality Bringing a New Reality to Postthoracotomy Lung Cancer Patients Via a Home-Based Exercise Intervention Targeting Fatigue While Undergoing Adjuvant Treatment. *Cancer Nurs*. janeiro de 2014;37(1):23–33.
189. Hoffman AJ, Brintnall RA, Given BA, von Eye A, Jones LW, Brown JK. Using Perceived Self-efficacy to Improve Fatigue and Fatigability In Postsurgical Lung Cancer Patients: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Cancer Nurs*. janeiro de 2017;40(1):1–12.
190. Janssen SMJ, Abbink JJ, Lindeboom R, Vliet Vlieland TPM. Outcomes of Pulmonary Rehabilitation After Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer Stages I to IIIa: AN OBSERVATIONAL STUDY. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. janeiro de 2017;37(1):65–71.
191. Henke CC, Cabri J, Fricke L, Pankow W, Kandilakis G, Feyer PC, et al. Strength and endurance training in the treatment of lung cancer patients in stages IIIA/IIIB/IV. *Support Care Cancer*. janeiro de 2014;22(1):95–101.
192. Messaggi-Sartor M, Marco E, Martínez-Télez E, Rodríguez-Fuster A, Palomares C, Chiarella S, et al. Combined aerobic exercise and high-intensity respiratory muscle training in patients surgically treated for non-small cell lung cancer: a pilot randomized clinical trial. *Eur J Phys Rehabil Med [Internet]*. fevereiro

de 2019 [citado 11 de julho de 2023];55(1). Disponível em:
<https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R33Y2019N01A0113>

193. Kuehr L, Wiskemann J, Abel U, Ulrich CM, Hummler S, Thomas M. Exercise in patients with non-small cell lung cancer. *Med Sci Sports Exerc.* abril de 2014;46(4):656–63.
194. Quist M, Sommer MS, Vibe-Petersen J, Stärkind MB, Langer SW, Larsen KR, et al. Early initiated postoperative rehabilitation reduces fatigue in patients with operable lung cancer: A randomized trial. *Lung Cancer.* dezembro de 2018;126:125–32.
195. Jankowski C. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Em.