



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO NA
HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA EM RATOS WISTAR
ALIMENTADOS COM DIETA BASAL OU HIPERLIPÍDICA

Marco Aurélio de Aguiar e Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Luís Fernando Barbisan
Orientador

BOTUCATU - SP

2012



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO NA
HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA EM RATOS WISTAR
ALIMENTADOS COM DIETA BASAL OU HIPERLIPÍDICA

Marco Aurélio de Aguiar e Silva

Prof.º. Dr. Luís Fernando Barbisan

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Aguiar e Silva, Marco Aurélio.

Efeitos do treinamento aeróbio na hepatocarcinogênese química em ratos
wistar alimentados com dieta basal ou hiperlipídica/ Marco Aurélio de Aguiar e
Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Capes: 4010500

1. Fígado – Câncer. 2. Carcinogênese – Estudos experimentais.
3. Exercícios físicos. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Exercício Físico; Fígado; Hepatocarcinogênese química;
Treinamento Aeróbio.

ÍNDICE

Capítulo I

Revisão da literatura

1 – Câncer.....	15
<i>1.1- Câncer: evidências epidemiológicas.....</i>	<i>15</i>
<i>1.2. - Carcinogênese química: aspectos gerais e sua modulação pelo exercício físico.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3- Hepatocarcinogênese.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4- Câncer e Exercício.....</i>	<i>22</i>
2 – Justificativa.....	26
3 – Objetivos.....	27
4 - Referências Bibliográficas.....	28

Capítulo II

Article.....	1
Abstract.....	4
1. Introduction.....	5
2. Materials and Methods.....	7
2.1. <i>Animal and experimental design.....</i>	<i>7</i>
2.2. <i>Tissue processing, histology and immunohistochemical procedures.....</i>	<i>8</i>
2.3. <i>Protein expression analysis.....</i>	<i>9</i>
2.4. <i>Lipid peroxidation analysis.....</i>	<i>10</i>
2.5. <i>Statistical analysis.....</i>	<i>11</i>
3. Results.....	12
4. Discussion.....	14
Legends, figures and tables.....	18
5. References.....	25

Dedicatória

Ao meu pai com carinho em meu coração a minha mãe que esta ao meu lado em todos os momentos e meus irmãos, Marcelo, Murilo e Mauricio, pelos ensinamentos diários feitos através de um singelo abraço, um choro, um afago ou uma ação realizada silenciosamente.

A todos o meu amor eterno e meu muito obrigado.

Grandes filósofos e pensadores ficaram conhecidos por explicar as façanhas que este mundo apresenta, mas ninguém consegue explicar a origem disso tudo. A não ser do seu próprio ponto de vista.

Renato Bedani

O presente trabalho foi realizado nas instituições:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu.
Distrito de Rubião Jr., S/N - Departamentos de Morfologia e de Patologia - CEP 18618-970.
Botucatu, SP, Brasil.

Agradecimento às instituições financeiras

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida ao aluno Marco Aurélio de Aguiar e Silva, processo 2010/03056-9.

A Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) pelo auxílio concedido, para a compra de ração.

Agradecimientos

- Agradeço Deus por tudo o que Ele me proporciona;
- A minha família, o centro de toda a minha formação;
- Os membros da banca examinadora, pelas valiosas análises e sugestões feitas ao trabalho;
- Os membros da banca de qualificação, pelas preciosas dicas dadas;
- Agradeço a minha amiga e mentora Kelly Silva Furtado, por todos os ensinamentos transmitidos e pelas horas de estudo;
- Agradeço ao meu colega e amigo Ivan José Vechetti Junior, por todos os trabalhos realizados em conjunto, e nossas conversas no biotério durante os treinamentos de nossos ratos;
- Agradeço ao José Eduardo Bozano e Ricardo Teixeira, técnicos do Departamento de Morfologia por todos os trabalhos realizados e prestados para que o resultado fosse esta dissertação.
- Gostaria de agradecer a camaradagem dos meus colegas do Laboratório de Carcinogênese Química Experimental e os amigos da UNESP/Botucatu. Não citarei nomes, pois com certeza não colocarei muitos, por um lapso de memória. Mas saibam que todos estarão comigo (presentes ou no meu pensamento) para sempre;
- Agradeço a Luciana Cristina Montes, secretária do Departamento de Morfologia, pela competência na organização e colaboração prestada, durante a realização deste trabalho;
- Por fim, agradeço aos ensinamentos dados por todos os professores que eu tive, durante os meus estudos;
- Que me perdoem as pessoas que eu não citei, mas mereciam estar aqui. Com certeza esses nomes estarão para sempre comigo, em meu sentimento de gratidão, carinho e companheirismo.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, pela sua disponibilidade, calma e compreensão. Seus ensinamentos através de atos de simplicidade e confiança foram indispensáveis para a minha formação.

“Não existe vento favorável, para quem não sabe o porto aonde quer chegar”.

Sêneca

Resumo

A atividade física mostra-se eficiente na melhoria da qualidade de vida de pacientes obesos e/ou com câncer, e tem mostrado efeitos benéficos contra a carcinogênese de cólon e mama em modelos de roedores. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito benéfico do treinamento aeróbico sobre a etapa de promoção da hepatocarcinogênese química em ratos Wistar alimentados ou não com dieta hiperlipídica. Os animais receberam dose única i.p. de 200 mg/kg de dietilnitrosamina no início do experimento para iniciação da hepatocarcinogênese. Duas semanas depois, os animais receberam quatro doses orais de 200 mg/Kg de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) e mais duas doses de 75 mg/kg de 2-AAF, dois e quatro dias após hepatectomia parcial de 70%. Na sexta semana do experimento, os animais receberam dieta padrão (DP, Grupos 1 e 2) ou dieta hiperlipídica (HP, Grupos 3 e 4) até o final da 22^a semana do experimento. Os animais dos Grupos 2 e 4 foram submetidos a cinco sessões semanais de natação (treinados) da 14^a a 22^a semana do experimento. Ao final da 22^a semana, os animais foram eutanasiados e amostras de fígado foram coletadas para análise (histológica, imunoistoquímica, bioquímica e molecular). Ao final do período experimental, os valores médios do peso corporal dos grupos submetidos ao treinamento de natação foram inferiores aos respectivos grupos não treinados alimentados com dieta basal ou hiperlipídica, embora sem diferença significativa. O grupo que recebeu dieta hiperlipídica (G3) apresentou maior teor de gordura corpórea e de colesterol total, mas com redução significativa no grupo treinado ($p < 0,05$). A concentração de hidroperóxido lipídico não diferiu entre os grupos não treinados e alimentados com dieta basal ou hiperlipídica. No entanto, uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de malonaldeído (MDA) foi observado no grupo da dieta basal e submetidos ao treinamento de natação quando comparados ao seu respectivo grupo controle (G1), indicando a atenuação do estresse oxidativo no fígado. Os níveis protéicos de PCNA, caspase-3 e bcl-2 foram analisados no fígado pela técnica de *western blotting*. Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de PCNA no grupo da dieta basal e submetidos a treinamento de natação (G2) em relação ao seu respectivo grupo controle (G1). Além disso, uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de bcl-2 e aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de caspase-3 clivada nos grupos submetidos ao treinamento de natação (G2 e G3) foram observados em relação aos respectivos grupos não treinados (G1 e G4). Após as análises histopatológicas, a principal lesão pré-neoplásica (PNL) observada nos diferentes grupos tratados foi caracterizada por focos de hepatócitos alterados (AFH), mostrando os diferentes tipos de fenótipos: células claras/eosinofílicas (as mais frequentes) ou células basofílicas. As lesões neoplásicas foram caracterizadas por adenomas hepatocelulares (AH), mostrando células com fenótipo eosinofílico. A incidência de diferentes tipos de PNL e HA não diferiram entre os grupos, mas o número médio de AH por área hepática foi significativamente reduzida ($p < 0,02$) no grupo da dieta basal e submetidos a treinamento de natação (G2), quando comparado ao respectivo grupo controle não treinados (G1) ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo sugerem que o treinamento aeróbio apresentou efeito benéfico sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas de fenótipo persistente e de adenomas hepáticos apenas no grupo alimentado com dieta padrão.

Capítulo I

Revisão da literatura

1. Câncer

1.1 - Câncer: evidências epidemiológicas

O câncer é um conjunto de síndromes de caráter crônico-degenerativo responsável por aproximadamente 12% das causas de morte no mundo, e representa a segunda maior causa de mortalidade, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (Guerra et al., 2005, Jemal et al., 2010). Além disso, devido ao crescimento exponencial, em poucos anos o número de mortes por câncer será mais elevado do que para as doenças cardiovasculares (Mathers and Loncar, 2006) (Figura 1).

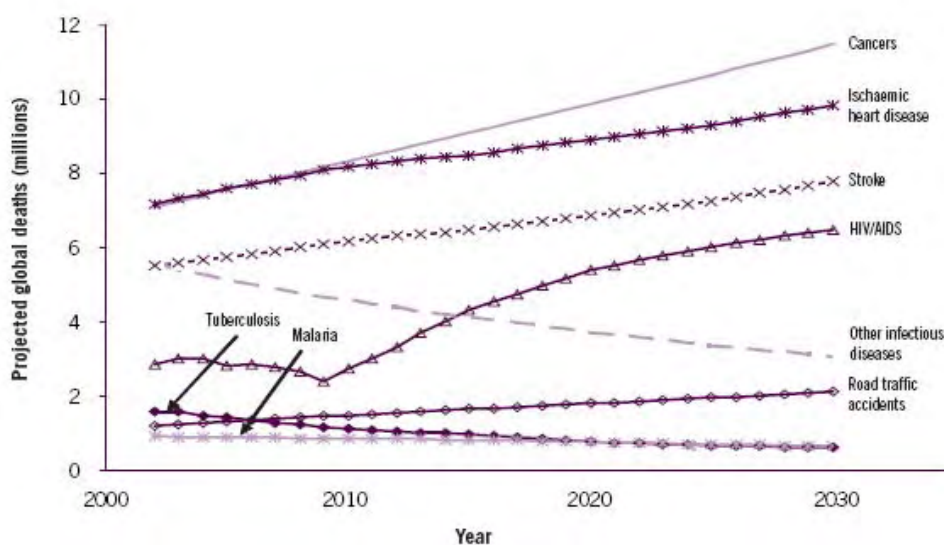


Figura 1 – Estimativa de taxas de mortalidade entre 2002 e 2030. Fonte: Mathers and Loncar, 2006.

Inúmeros fatores estão associados à elevada taxa de morbidade/mortalidade pelo câncer. Dentre eles, incluem-se mudanças de estilo de vida decorrentes do processo crescente de industrialização e aumento da expectativa de vida que levam a maior prevalência de enfermidades crônico-degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer e outros agravos relacionados ao envelhecimento e à obesidade (Albala et al., 2001, Waters, 2001 Guerra et al., 2005; Mathers et al., 2006). Além disso, o diagnóstico tardio e, conseqüentemente, a maior dificuldade no tratamento do câncer avançado contribui para o aumento nas taxas de mortalidade relacionadas a essa doença (Parkin et al., 2001, Jemal et al., 2010, 2011).

Estimativas para 2010 indicam aumento no número de novos casos das neoplasias de próstata, pulmão, cólon/reto e bexiga em homens e das neoplasias de mama, pulmão, cólon/reto e colo do útero em mulheres em abrangência mundial (Jemal et al., 2010) (Figura 2).

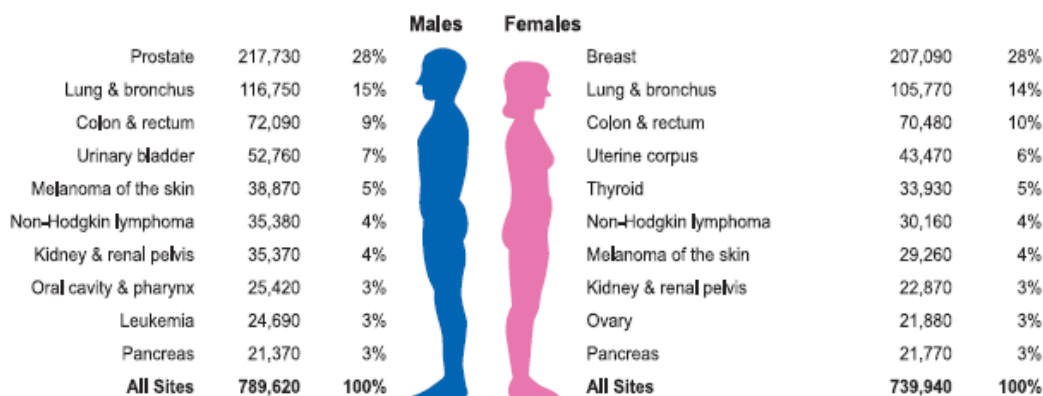
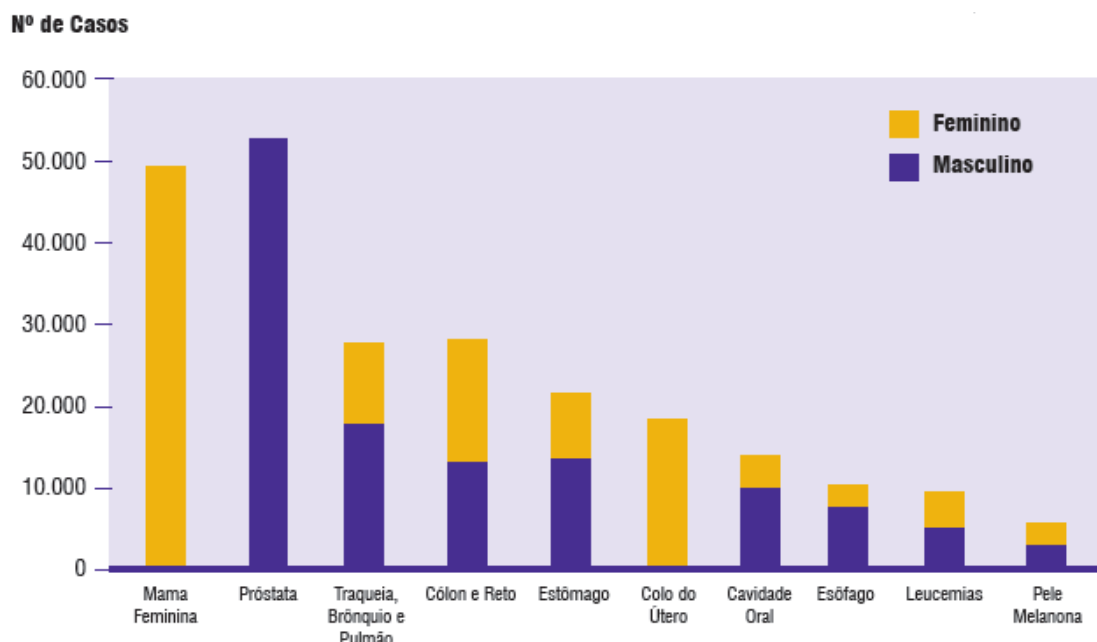


Figura 2 – Estimativa de novos casos de câncer no mundo em homens e mulheres em 2010. Fonte: Jemal et al., 2010.

Dados epidemiológicos e clínicos no Brasil indicam que as neoplasias de próstata, pulmão, cólon/reto, estômago e esôfago tem maior prevalência em homens, enquanto nas mulheres as neoplasias de mama, colo uterino, pulmão e cólon/reto são consideradas as de maior incidência (INCA, 2009) (Figura 3). Quanto à mortalidade, neoplasias de pulmão, próstata, estômago, esôfago, boca e faringe são responsáveis pelo maior índice de mortes por câncer em homens, e as neoplasias de mama, pulmão, colo de útero, estômago, cólon/reto são responsáveis pelo maior índice em mulheres, no mundo (WHO, 2002). As incidências regionais das neoplasias estão diretamente relacionadas aos hábitos de vida, condições sócio-econômicas e de alimentação, influenciadas pelas características genéticas individuais e familiares e étnicas (Parkin, 2001).



Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/ MS

Figura 3 – Tipos de neoplasias mais incidentes estimadas para 2010 na população brasileira. Fonte: INCA, 2009.

As neoplasias apresentam crescimento e padrões de diferenciação alterados, podendo ser neoplasias benignas, que acometem um órgão específico sendo auto delimitado ou neoplasias malignas com a capacidade de invasão dos tecidos vizinhos (Robins and Cotran 2005). O maior perigo não é o tumor em si, mas sua capacidade de formação de metástases em locais distantes do sítio primário. Enquanto o tumor primário continua a crescer, clones de células tumorais com elevado grau de mutações se destacam da massa principal e seguem para colonizar outras áreas do organismo humano (Robins and Cotran 2005; Gravitz, 2011). Em geral, nos estágios avançados de desenvolvimento tumoral, as células transformadas apresentam uma série de alterações gênicas que as tornam altamente invasivas e resistentes a medicamentos antitumorais (Gravitz, 2011). Essas características associadas aos mecanismos intrínsecos das células neoplásicas, como mecanismos de escape da vigilância imunológica (i.e., perda da expressão de moléculas de complexo principal de histocompatibilidade, baixa expressão de antígenos tumorais, produção de citocinas inibitórias), dentre outros, dificultam o sucesso do tratamento em alguns casos (Dierssen et al., 2006). O processo de metástase em um tecido tumoral depende de uma série de características adquiridas pelas células malignas no decorrer do processo de transformação celular. Alterações genéticas acumulativas estão envolvidas no aparecimento de tumores malignos capazes de disseminar e invadir tecidos distantes do próprio hospedeiro. Algumas características bem descritas em tumores malignos são: (a) perda da coesão intercelular das células tumorais umas das outras e do tecido adjacente, (b) degradação da matriz extracelular e da membrana basal, (c) fixação a componentes ancoradouros de locomoção da matriz (fibronectina, laminina e colágeno) e (d) migração e colonização de tecidos distantes (Robins and Cotran 2005). Assim, na metástase, as células malignas se espalham por diversos tecidos e órgãos do paciente ou animal. Nesses novos locais, essas células utilizam nutrientes, espaço e desequilibram o microambiente quimio-eletrostático das células normais, podendo resultar em caquexia, falência múltipla de órgãos e morte do paciente ou animal.

Além disso, as células neoplásicas metastáticas podem formar blocos trombóticos no sistema vascular e implantes monoclonais em múltiplos tecidos do hospedeiro. Em ambos os casos o tecido de origem pode ser reconhecido de acordo com as características morfológicas das células, dependendo do grau de diferenciação em que estão. A diferenciação celular é um processo complexo e de múltiplas etapas no qual a célula adquire funcionalidades e especializações para a formação de um determinado tecido do organismo. O passo inicial da diferenciação celular é a instalação de um programa genético específico ao tecido em questão, que inclui o silenciamento de alguns genes e ativação de outros de acordo com a futura função da célula no tecido (Marchal et al., 2006). No decorrer das etapas de diferenciação, as funções biológicas das células são reguladas de

acordo com o tipo celular, resultando em células que podem ser distinguidas das demais células de funções diferentes no mesmo tecido. A diferenciação terminal é a última etapa, na qual as células assumem uma função definida no tecido. Assim, nas células malignas, os controles do ciclo celular e da diferenciação estão em desequilíbrio, resultando em células com elevada capacidade de multiplicação e baixa diferenciação (Robins and Cotran 2005). Apesar do alto grau de anaplasia (indiferenciação celular) dos enxertos metastáticos, muitas vezes algumas poucas características herdadas do tecido de origem permanecem nas células malignas enxertadas.

Os dados epidemiológicos preocupantes e o melhor entendimento da biologia dos tumores impulsionam os pesquisadores a tentarem entender melhor a evolução dessa doença. Assim, os estudos podem ser direcionados para a descoberta de suas causas e/ou relacioná-la com fatores de risco, com o intuito de desenvolver novos métodos de prevenção e tratamento. Nas fases iniciais destes estudos são utilizados modelos pré-clínicos em roedores elaborados através da inoculação de células tumorais ou da administração de agentes químicos carcinogênicos para indução de tumores (carcinogênese química) (Mamasivayam, 2011).

1.2 - Carcinogênese química: aspectos gerais

Os agentes químicos começaram a serem reconhecidos como potencialmente cancerígenos para o homem em meados do século XVIII. Este fato foi observado após um alto índice de neoplasias nasais e de pele do escroto detectado em homens que, quando crianças trabalhavam limpando chaminés, sendo expostos a rapé e foligem. Desta forma, a partir do século XX, foram iniciados trabalhos utilizando modelos animais de carcinogênese química para o estudo da biologia tumoral e detecção de substâncias com potencial cancerígeno (Rodrigues and de Camargo 1999, Robins and Cotran, 2005).

O processo de carcinogênese química em roedores é complexo e evolui através de múltiplas etapas denominadas de iniciação, promoção e progressão (Pitot, 2001, 2007). Entende-se por iniciação a interação irreversível de um agente químico com o DNA da célula-alvo, levando a alterações permanentes na estrutura do DNA tais como ligações covalentes, distorção ou quebra da molécula em fita simples ou dupla (Pitot, 2001, 2007). Se as células com danos no DNA não sofrerem a ação do sistema de reparo do DNA e/ou forem eliminadas por apoptose, estas formarão as chamadas células iniciadas. A promoção é caracterizada pela expansão clonal de células iniciadas levando ao aparecimento das lesões pré-neoplásicas (Pitot, 2001, 2007), que apresentam importantes modificações em níveis morfológicos e moleculares, incluindo aquelas em genes que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose celular. (Cordon-Cardo 1998, Ray et al., 2007).

Quando as lesões adquirem características de malignidade tem-se a fase de progressão (Pitot 2001, 2007), na qual são observadas inúmeras alterações genotípicas, relacionadas à proliferação celular/apoptose, invasividade, capacidade metastática, fornecendo substrato biológico para a manifestação clínica do câncer (Rodrigues and de Camargo 1990, Robins and Cotran, 2005).

Os cancerígenos químicos podem atuar nas diferentes etapas da carcinogênese. Os agentes iniciadores podem ser enquadrados em duas grandes categorias: 1) compostos de ação direta, que não exigem biotransformação para exercer sua carcinogenicidade e 2) compostos de ação indireta, ou pré-cancerígenos, que exigem conversão metabólica para produzir cancerígenos finais com caráter nucleofílico, como exemplo os agentes alquilantes que induzem mutações no DNA ou a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, que são capazes de levar a lesões oxidativas e transformar as células-alvo (Preston and Williams 2005). As células iniciadas, com alterações permanentes em seu DNA, passam a se proliferar em ritmo diferente das outras células normais, adquirem novas mutações e respondem de maneira mais efetiva aos compostos promotores, exógenos ou endógenos (Preston and Williams 2005).

De forma geral, os modelos de carcinogênese química em roedores requerem longo tempo de acompanhamento dos animais para observação de neoplasias, tornando-os dispendiosos e de execução laboriosa. Por esta razão, existe grande interesse na utilização de ensaios mais rápidos, que permitam detectar alterações que precedam o aparecimento das neoplasias tais como lesões proliferativas e/ou pré-neoplásicas (Steele, 2010). Essas alterações, designadas de biomarcadores, estão associadas a estágios iniciais do processo de carcinogênese e podem ser identificadas em nível molecular, celular ou morfológico (Ward and Henderson 1996, Pereira et al., 1994). Como exemplo, podem ser citadas as alterações estruturais precoces no cólon, mama e bexiga de roedores. Na mama podem ser encontradas as displasias e hiperplasias epiteliais (Cardiff and Wellings 1999; Cardiff, 2010); na bexiga, as hiperplasias simples e as hiperplasias papilíferas/nodulares (Cohen 1998, Cohen 2002) e na mucosa do cólon, as criptas aberrantes, que podem ser identificadas como únicas ou na forma de focos de criptas aberrantes (Femia and Caderni 2008). Além disso, os animais de experimentação são utilizados em vários modelos de carcinogênese de órgão-alvo definido como para mama, pulmão, fígado, cólon, intestino, bexiga, rim, próstata, ovário, cabeça e pescoço, esôfago, pâncreas, todos com potencial para investigar a etiologia e progressão do câncer e de fatores de risco e proteção (Steele, 2010).

1.3 - Hepatocarcinogênese

O fígado é a maior glândula do organismo humano e animal sendo constituído de dois tipos principais de células, os hepatócitos e as células epiteliais ductais, bem como as encontradas no espaço de Disse (células de Ito ou Estreladas), nos sinusóides (células endoteliais e de Kupffer) e no tecido conjuntivo do espaço porta (fibroblastos, linfócitos, polimorfonucleares) (Kierszenbaum, 2004; Martins and Neuhaus, 2006). O fígado tem a tarefa de manter a homeostase metabólica corporal, que inclui o processamento dos aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas; síntese de proteínas séricas, metabolismo de hormônios e biotransformação de compostos químicos com conseqüente liberação no sangue e na bile de resíduos endógenos e xenobióticos, sendo, portanto, um alvo freqüente de inúmeras doenças (Robbins and Cotran, 2005).

O fígado é alvo comum de inúmeras agressões metabólicas, circulatórias, tóxicas, virais e neoplásicas que levam ao desenvolvimento de lesões hepatocíticas, colangiocelulares e estromais (Crawford, 2000; Hardisty e Brix, 2005). Por ser o principal órgão de biotransformação de substâncias químicas (xenobióticos), o fígado é frequentemente acometido por insultos tóxicos decorrentes dos processos enzimáticos de fase I e II (Piñeiro-Carrero e Piñeiro, 2004). O carcinoma hepatocelular (HCC) é a quinta neoplasia mais comum no mundo e a terceira neoplasia com maior índice de mortalidade, considerada de baixo prognóstico e sobrevida dos pacientes (El-serag and lenhard rudolph, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2004 o HCC acometeu cerca de 564 milhões de pessoas no mundo, na sua maioria do sexo masculino (Bosch et al., 2004). Estes dados demonstram a importância de estudos de prevenção contra o desenvolvimento do HCC.

Existem varias características epidemiológicas interessantes sobre o HCC, dentre elas as variações acentuadas entre regiões geográficas, grupos raciais e étnicos, homens e mulheres, fatores ambientais bem documentados (Figura 4). A distribuição de regiões do planeta com maior ou menor incidência de hepatocarcinoma não é também uniforme, provavelmente devido a diferentes exposições aos diversos agentes ambientais e variáveis, desiguais estilos de vida. (El-serag and lenhard rudolph, 2007)

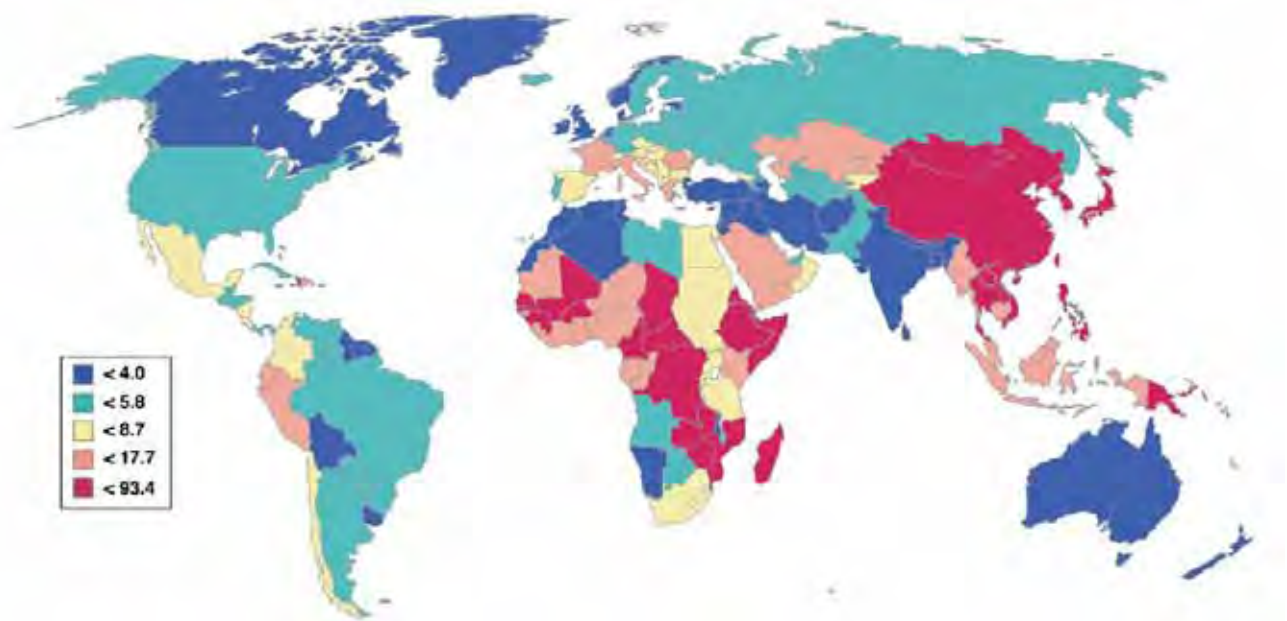


Figura 4- Variações regionais nas taxas de mortalidade de HCC categorizados por taxas de mortalidade ajustadas por idade. As taxas são relatadas por 100.000 pessoas

É extremamente alta a incidência de HCC em algumas áreas do Sudeste da Ásia e África do Sul, onde a infecção viral por hepatite B e C infecção e exposição à aflotoxina B1, estes fatores de riscos são bem conhecidos e estabelecidos. Estudos sugerem que o HCC esta intimamente relacionado as doenças da síndrome metabólica assim proporcionando maior risco e progressão destas doenças para um HCC, como por exemplo: resistência à insulina, obesidade e diabetes e consumo excessivo de álcool. O álcool poderá ser considerado um fator de baixo risco para o desenvolvimento do HCC nos próximos anos, no entanto, a obesidade e a diabetes podem se tornar os fatores de maior risco sendo os mais importantes para o quadro de desenvolvimento do hepatocarcinoma. (McGlynn and London, 2011).

Outras doenças hepáticas como esteatose, esteato-hepatite podem evoluir para o HCC. Brenner (2009) relata que nos países desenvolvidos a infecção pelo vírus da hepatite C foi a principal causa de fibrose hepática no século 20, já no século 21 a principal causa é a Esteatose Hepática Não Alcoólica (EHNA). A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) tem sido considerada atualmente a forma mais comum de doença hepática no mundo ocidental, relacionada principalmente ao aumento da prevalência da obesidade. A DHGNA abrange um largo espectro de doenças, desde casos de esteatose simples (ENA) até a EHNA e fibrose, podendo evoluir para cirrose e HCC (Promrat, 2010). Embora se conheçam os fatores predisponentes para o desenvolvimento da EHNA, sua patogênese, assim como tratamento eficaz, permanece pouco conhecido (Abby et al., 2009). A EHNA consiste em esteatose e inflamação lobular hepática em indivíduos sem história de alcoolismo crônico (McCullough, 2004). Ocorre associada à obesidade,

hiperlipidemia, diabetes mellitus, sexo feminino, medicamentos e ‘bypass’ jejunoileal. O termo inclui um grande número de alterações, desde ENA até a EHNA e com possibilidade de evolução para cirrose com diferentes prognósticos e história natural. As anormalidades parecem se correlacionar com resistência à insulina e síndrome metabólica (Abby et al., 2009). A ENA é definida como o acúmulo de lipídeos, primariamente triacilgliceróis, em indivíduos que não apresentam grande consumo de álcool (<20g etanol/dia para mulheres e <30g para homens) (Venturi et al., 2004; Colicchio et al., 2005).

A EHNA é uma forma progressiva da ENA, diagnosticada por análise histopatológica e ambas são reconhecidas como manifestações hepáticas da síndrome metabólica (Brunt et al., 1999). A EHNA é a forma mais comum de doença hepática crônica em adultos e, provavelmente, em crianças. Nestas, a ENA pode evoluir para EHNA e resultar em síndrome metabólica na fase adulta (Lavine and Schwimmer, 2005). A síndrome metabólica é definida como o aumento do índice de massa corpórea (IMC) ou da circunferência da cintura (Alberti, 2005) e representa um conjunto de problemas que inclui obesidade, dislipidemia, diabetes e resistência a insulina. Uma das manifestações hepáticas da síndrome metabólica é a EHNA, que é responsável pela maioria dos casos de HCC criptogênicos nos Estados Unidos, onde a prevalência de síndrome metabólica cresce proporcionalmente ao aumento dos casos de obesidade (Farrel, 2006; Adans, 2007). Na síndrome metabólica, o tecido adiposo induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outras adipocinas tanto em humanos como em modelos animais (Rega, 2007). O VEGF promove o processo de angiogênese tanto no organismo sadio como doente o que poderia promover a expansão das neoplasias (Ferrera, 2003). Em adição, a EHNA é considerada uma via para doença hepática avançada, cirrose e sua evolução para o HCC (Di Mauro, 2009). Dentre as causas de EHNA está a susceptibilidade genética, porém, é mais aceito que os principais fatores desencadeantes da EHNA sejam fatores ambientais como dieta e atividade física, visto que a ingestão elevada de gordura e pouca ou ausência de atividade física é um fator determinante da obesidade (Havel, 2005; Di Mauro, 2009).

1.4 - Câncer e Exercício

Como já mencionado anteriormente, a incidência de câncer na população está intimamente relacionada ao estilo de vida dos indivíduos, sendo a obesidade relacionada a maior susceptibilidade a alguns tipos de neoplasias como as de mama e de cólon (Schoenberg, 2009). Estudos demonstram que a atividade física é benéfica à saúde mental e física de pessoas sadias ou acometidas por enfermidades (doenças respiratórias, câncer, doenças da síndrome metabólica) (Paffenbarger, 1993;

Evans, 1999; Courneya, 2001, 2007; Bergasa, 2004). Nesse sentido, a prática da atividade física ou de um treinamento específico (aeróbio ou resistido) pode colaborar no tratamento da depressão, ansiedade e outros distúrbios de natureza psicológica, bem como levar a melhora da força e equilíbrio, redução no grau de obesidade para que haja melhora da qualidade de vida das pessoas (Evans, 1999; Courneya, 2001, 2007; Bergasa, 2004). Além disso, Vieira e colaboradores (2009) relataram efeitos benéficos da prática regular de exercícios físicos em camundongos obesos, na diminuição do grau de inflamação hepática fígado, na perda de gordura, na diminuição dos níveis de resistência à insulina e no aumento dos níveis de adiponectina, este um marcador importante na proteção hepática (Figura 5).

Em atletas tem sido descrito aumento nas defesas antioxidantes endógenas via catalase e superóxido dismutase (SOD) induzida pelo trabalho muscular (Ducan et al., 1997). Em longo prazo, o treinamento físico promove maior síntese de catalase e SOD nas células do organismo, a fim de suprimir as altas quantidades de espécies reativas do oxigênio (ROS, radicais livres) decorrentes de um maior consumo mitocondrial de oxigênio (Packer et al., 2007). Além disso, a aptidão cardiorrespiratória, medida pela capacidade máxima de captação de oxigênio (VO_2 máx) apresenta-se inversamente correlacionada às concentrações de proteína C-reativa (Kuo et al., 2007), sugerindo menor atividade inflamatória em indivíduos treinados aerobiamente. Assim, o treinamento aeróbio regular tem sido apontado como uma medida adequada para ativação da defesa antioxidante e redução da atividade inflamatória do organismo (Kuo et al., 2007; Packer et al., 2007). Estudos mostram que quando falamos de câncer e exercício físico temos inicialmente o objetivo de obtenção do bem estar e a melhor qualidade de vida do paciente com neoplasia (Cramp et al., 2010). De fato, estudos clínicos indicam que indivíduos com diagnóstico de câncer e que realizam exercícios físicos tem sua qualidade de vida melhorada (Schmitz et al., 2005 and McNeely et al., 2006).

O exercício melhora o sistema cardiovascular nos pacientes em tratamento ou após tratamento do câncer, levando a diminuição dos efeitos colaterais da quimioterapia ou radioterapia (Schmitz et al., 2005). O exercício se mostra com ação benéfica como adjuvante no tratamento de varias doenças por ser uma medida eficaz e de baixo custo (Leyk, 2009). O exercício se mostra eficaz no tratamento adjuvante dos vários tipos de neoplasias visto que os estudos mostram que o exercício tem papel terapêutico e preventivo em pessoas acometidas pela doença, desde que realizado pelos pacientes de forma regular em hospitais ou em suas próprias casas (Leyk, 2009).

Segundo Matthew and Emily (2010), os níveis de atividade física mais elevada (frequência e duração), que compreende exercícios moderados a vigorosos, parecem ter benefícios na modulação do risco de câncer de mama. Estudos mostram que se tem um risco menor para o desenvolvimento do câncer em homens e mulheres que realizam a pratica de exercício regularmente. (Schoenberg,

2009). Embora muitos estudos foquem na eficácia do exercício físico nas cardiopatias, na qualidade de vida, sobrepeso e composição corporal, outros estudos têm como referências os efeitos sobre os outros biomarcadores tais como os de controle metabólico e funções imunológicas (Jones, 2010). Em um de seus trabalhos de revisão, Na (2011), aponta para a existência de protocolos de exercício físico que não se mostram benéficos na redução da evolução da carcinogênese química experimental, devido ao volume e intensidade que os mesmos foram realizados. Na (2011) e Cramp e colaboradores (2010) ressaltam em seus estudos que o treinamento de resistência combinado com o treinamento aeróbio pode ser também benéfico tanto quanto o treinamento aeróbio isolado. É também importante ressaltar que poucos estudos avaliam a possível interação do treinamento físico na eficácia da terapia convencional em pessoas acometidas por neoplasias (Jones, 2009). Com os estudos nesta nova área do conhecimento exercício-oncologia, os pesquisadores e clínicos e da área básica vem dando maior ênfase ao papel do exercício físico em pacientes oncológicos em estágios mais iniciais da doença, no sentido de reduzir os efeitos nocivos da terapia oncológica (radioterapia e quimioterapia) e aumentar a eficiência do tratamento (Jones, 2010).

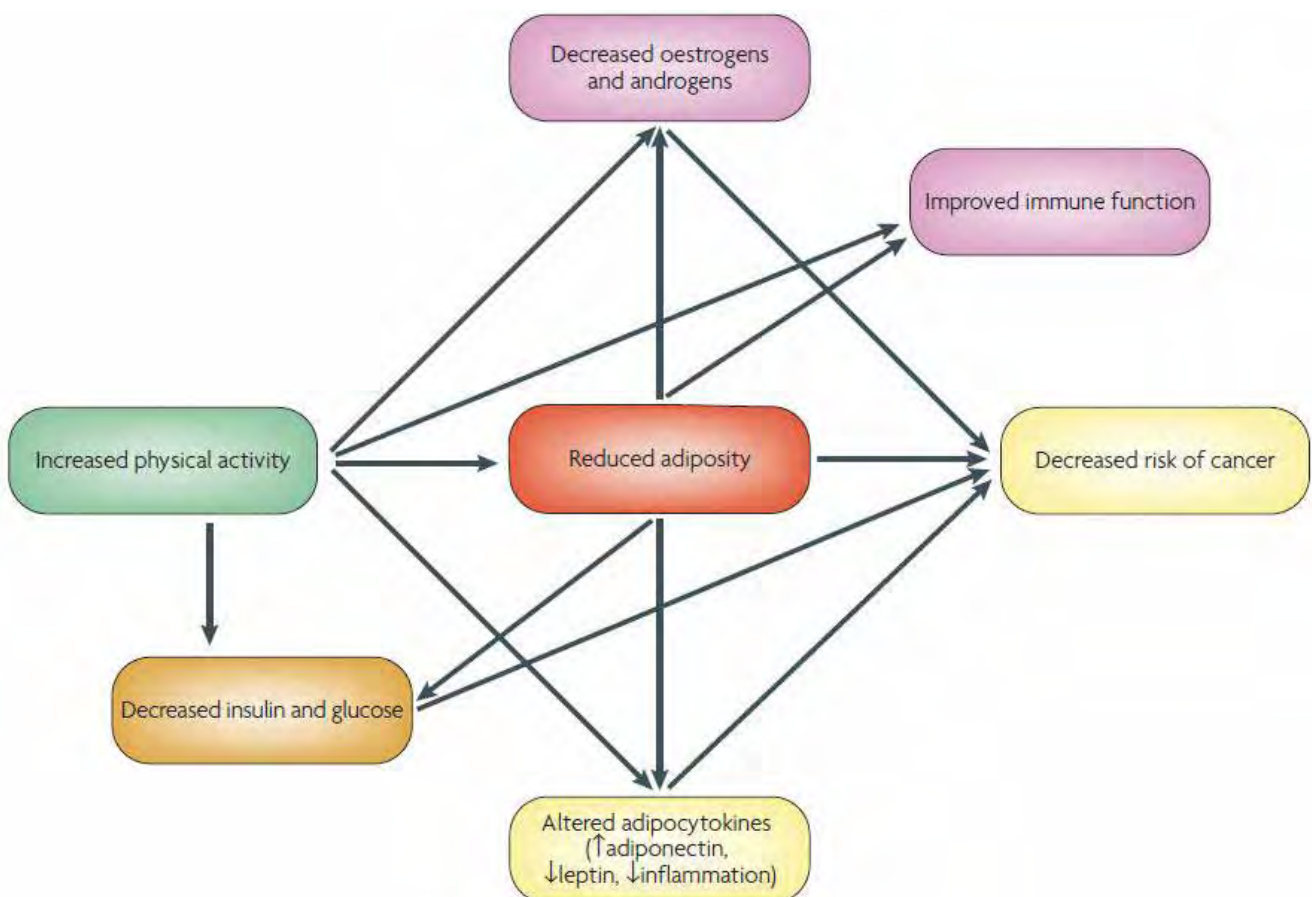


Figura 5 – Mecanismos hipotéticos ligando a atividade física à redução do risco de desenvolvimento do câncer. A atividade física pode funcionar através da redução da quantidade de tecido adiposo (adiposidade), o que reduz a produção de hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos), insulina, marcadores inflamatórios e leptina, diminuindo assim a exposição a esses

hormônios e peptídeos potencialmente cancerígenos, melhora na função imune, reduzindo o risco de câncer. Fonte: MC Tiernan., 2008.

Com um papel benéfico já comprovado na redução do risco do câncer, o sistema imunológico tem potenciais para eliminar do organismo células neoplásicas através da resposta imune inata e adquirida (Nieman, 1997; Jakobisiak, 2003; Wermore and Ulrich, 2006). Poucos trabalhos enfocam os efeitos da atividade física sobre o sistema imunológico, mas estes indicam que a atividade física poderia melhorar atividade das células NK (*natural killer*), uma célula da resposta imune inata com potencial para eliminar células tumorais (Wermore and Ulrich, 2006). A prática regular de exercícios físicos pode também aumentar a atividade de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (Nieman, 1997). Na prática de uma atividade física intensa (crônica) existe uma relação dose resposta, com uma curva na forma de em J, entre a intensidade da atividade física e a resposta do sistema imune, ou seja, a atividade física feita com moderação acarretaria em ativação do sistema imune enquanto o treino intenso exaustivo acarretaria em imunossupressão (Wermore and Ulrich, 2006).

A atividade física vem sendo recomendada como terapia adjuvante para vários tipos de cânceres, se tornando então uma boa estratégia de saúde publica, intervenção e redução no impacto desta doença, com custos e riscos relativamente baixos (McTiernan, 2008) (Figura 6). Os estudos com treinamento físico iniciaram-se no final de 1980, como uma intervenção apropriada para diminuir os efeitos colaterais da quimioterapia e da radiação, que causam fadiga e perda de aptidão cardiorrespiratória, em mulheres com câncer de mama em estágio inicial (Figura 6) (Brown et al., 2003, Winningham, and MacVicar 1989, Winningham et al., 1989, MacVicar et al., 1989, Winningham, 1991, Gianni et al., 2001).

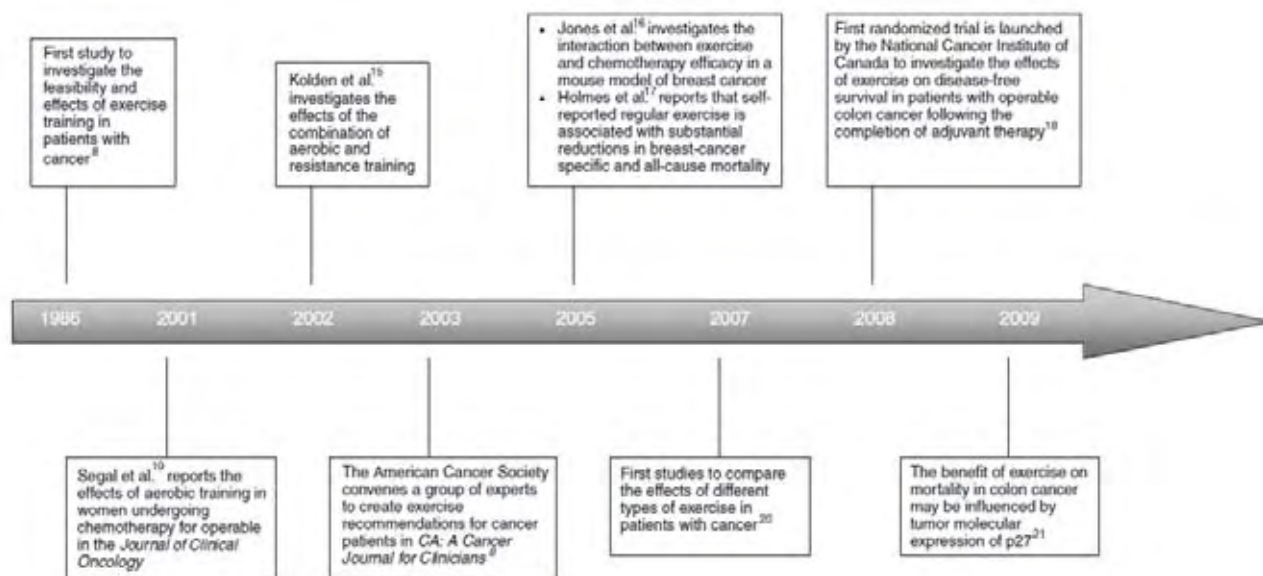


Figura 6 – Exercício e Oncologia linha do tempo. Fonte: Jones et al., 2010.

Para entendermos melhor a interface dos mecanismos envolvidos na atividade física e no desenvolvimento do câncer, poderíamos lançar mão de estudos experimentais para indentificar as associações entre a atividade física e o câncer. Com isso teremos evidências para introduzir a atividade física no cotidiano individual e coletivo e nas campanhas preventivas de saúde pública. Já em outro plano temos a visão de que com a identificação e o conhecimento destes mecanismos poderemos prescrever a atividade física com mais propriedade para indivíduos acometidos pelo câncer ou de risco elevado e com histórico familiar (McTiernan, 2008).

2- JUSTIFICATIVA

O estilo de vida e a falta de atividade física em que estamos sujeitos nos levam a diversos problemas de saúde pública. Dentre estes problemas pode-se citar a esteatose e a esteatohepatite não alcoólicas, que, se forem mantidas por período prolongado, podem levar a danos hepáticos como fibrose, cirrose e chegar ao HCC. Considerando-se que existem alguns estudos que demonstraram efeito benéfico do exercício aeróbico sobre a evolução das neoplasias de cólon e mama, existe a possibilidade de que associações semelhantes sejam encontradas para outros tipos de neoplasias. No entanto, não foram encontrados dados na literatura indicando se o treinamento aeróbico, em médio prazo, pode promover alterações fisiológicas benéficas durante as diferentes fases da carcinogênese hepática em humanos e em roedores, em especial o rato. Devido à falta de dados consistentes a esse respeito, existe a necessidade da realização de estudos que colaborem para o entendimento do papel do exercício físico, em especial da natação que é considerada um exercício completo, nos processos de desenvolvimento da ENA, EHNA e sua evolução para neoplasia hepática experimental em ratos.

Apesar do fígado dos ratos apresentarem uma estruturação diferenciada e mais lobulada do que a espécie humana, há uma similaridade entre os seus lobos e os setores hepáticos do fígado humano. Ambas as espécies pertencem à Classe *Mammalia* e, com isso, apresentam o desenvolvimento embriológico semelhante (Langsch et al., 2009). Assim, utilizando-se de modelos experimentais podemos mimetizar doenças hepáticas humanas, incluindo o desenvolvimento de lesões precursoras e HCC, a ENA e a EHNA. Entretanto, poucos estudos nestes modelos enfocam a evolução dessas doenças hepáticas com os benefícios do exercício físico.

3- OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o papel do exercício aeróbio (natação) durante o desenvolvimento e evolução da etapa de promoção da hepatocarcinogênese química em ratos submetidos ao protocolo do hepatócito resistente (Tatematsu et al., 1983; Semple-Roberts et al., 1987) e submetidos ou não a dieta hiperlipídica.

Específicos:

Avaliar o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas; os níveis de proliferação celular e de apoptose nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas; os diferentes graus de esteatose e acúmulo de lipídeos no fígado, e mensurar os níveis de lipoperóxidos.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abby, B., Siegel, M.D., Andrew, X., Zhu, M.D. Metabolic Syndrome and Hepatocellular carcinoma. American Cancer Society. 2009; v.115:5651–61.

Adams, L.A., Lindor, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol.* 2007;v17:p;863-69.

Albala, C., Vio, F., Kain, J., Uauy, R. Nutrition transition in Latin America: the case of Chile. *Nutr Rev.* 2001;59:170-6.

Alberti, K.G., Zimmet, P., Shaw, J.. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. *Lancet.* 2005; p 1059-62.

American College of Sports Medicine. Position Stand: Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2002; 34(2): 364-380.

Bergasa, N.V., Mehlman, J., Bir, K. Aerobic exercise: a potential therapeutic intervention for patients with liver disease. *Medical Hypotheses.* 2004; (62): 935-941.

Brenner, D.A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* 2009;v120 p.361-7.

Bosch, F.X., Ribes, J., Díaz, M., Cléries, R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterol.* 2004; 127:5-16.

Brunt, E.M., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; v94:2467–74.

Brown, J.K., Byers, T., Doyle, C. Nutrition and physical activity during and after cancer treatment: an American Cancer Society guide for informed choices. *CA Cancer J Clin.* 2003; 53:268-291.

Cardiff, R.D., Wellings, S. R. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1999;4:105-22.

Cohen, S.M. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. *Toxicol Pathol.* 2002;30:663-71.

Colicchio, P., Tarantino, G., del Genio, F., Sorrentino, P., Saldalamacchia, G., Finelli, C., Conca, P., Contaldo, F., Pasanisi, F. Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in South Italy. *Ann Nutr Metab.;* v49:p289–295, 2005.

Cohen, S.M. Urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 1998;26:121-7.

Cordon-Cardo, C. Molecular alterations in bladder cancer. *Cancer Surv.* 1998;32:115-31.

Courneya, K.S., Karvinen, K.H. Exercise, Again and cancer. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2007; (32): 101-107.

Courneya, K.S. Exercise interventions during cancer treatment biopsychosocial outcomes. *Exerc. Sport. Sci. rev.* 2001; 29(2): 60-64.

Crawford, J.M. O fígado e o trato biliar. In: Cotran RS. Kumar V. Collins T. Robbins – *Patologia Estrutural e Funcional*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; p. 759-808.

Cramp, F., James, A., Lambert, J. The effects of resistance training on quality of life in cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Support Care Cancer.* 2010;18:1367-1376.

de Camargo J.L.V., Salvadori, D.M., Rocha, N.S., Barbisan, L.F., Ribeiro, L.R. The detection of chemical carcinogens in an alternative medium-term bioassay. *Ciênc Cult.* 1999;51:22-6.

Di Mauro, D., Pagano, F., Magaúda, L., Speciale, F., Speranza, G., Bonaiuti, M., Mallamace, A., Trimarchi, F. Aerobic exercise and non-alcoholic fatty liver: a case report. *J Sports Med Phys Fitness.* 2009; v49 (4):448-52.

Dierssen, J.W., de Miranda, N.F., Mulder, A., van Puijenbroek, M., Verduyn, W., Claas, F.H., et al. High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2006 p6:233.

Ducan, K., Harris, S., Ardies, C.M. Running may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. *Cancer Lett.* 1997; v.116 (2):151-8.

El-serag, H.B., Lenhard Rudolph, K. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007; p132:2557–2576.

Evans, W.J. Exercise training guidelines for the elderly. *Med Sci Sports Exerc.* 1999; 31:12-7.

Farrel, G.C., Larter, C.Z. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis *Hepatology.* 2006; v43(suppl 1): p. S99-112.

Ferrera, N., Gerber, H.P., Lecourter, J. The Biology of VEGF and its Receptors. *Nature Medicine.* 2003; V9:669-76.

Femia, A.P., Caderni, G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Med.* 2008;74:1602-7.

Gianni, L., Dombernowsky, P., Sledge, G. Cardiac function following combination therapy with paclitaxel and doxorubicin: an analysis of 6.57 women with advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 2001; 12:1067-1073.

Gravitz, L. Chemoprevention First line of defence, Combinations of drugs are showing some promise as therapeutic agents that stop cancer before it starts. *Nature.* 2011; vol 471.

Guerra, M.R., Gallo, C.V.M., Azevedo, G., Mendonça, S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. *Rev Bras de Cancerol.* 2005;51:227-34.

Havel, P.J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev.* 2005; v63:133–57.

Hardisty, J.F.; Brix, A.E. Comparative hepatic toxicity: prechronic/chronic liver toxicity in rodents. *Toxicol. Payhol.* 2005; v.33,p.35-40.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Jakobisiak, M., Lasek, W., Golab, J., Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett.* 2003. 90:103-122.

Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., Ward, E.M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:1893-907.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:277-300.

Jemal, A., Bray, F., Ferlay, F., Melissa, M., Ward, E., Forman, D., Global Cancer Statistic, *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.

Jones, L.W., Eves, N.D., Haykowsky, M. Exercise intolerance in cancer and the role of exercise therapy to reverse dysfunction. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 598-605.

Jones, L.W., Peppercorn, J., Scoot, Battaglini, C. Erratum to: Exercise /therapy in the Management of Solid Tumors. *Current Treatment Options in Oncology.* 2010; 11: 73-86.

Kierszenbaum, A.L. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

Kuo, H.K., Yen, C.J., Chen, J.H. *et al.* Association of cardiorespiratory fitness and levels of C-reactive protein: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Am. J. Cardiology.* 2007; v. 114: 28-33.

Langsch, A., Giri, S., Acikgöz, A., Jasmund, I., Frericks, B., Bader, A. Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. *Toxicology letters.* 2009; 188 (3): 173-179.

Lavine, J.E., Schwimmer, J.B.. Pediatric non-alcoholic steatohepatitis. In: Farrell G, George J, Hall P, Mccollough A. editors. *Non-alcoholic esteatohepatitis.* Oxford: Blackwell Publishing. 2004; p. 229-40.

Leyk, D. The Preventive and therapeutic roles os regular physical activity. . *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(44): 713-4.

Martins, P.N.A. and Neuhaus, P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ductos in the rat. *Liver Int.* Issn. 2006; 1478-3223.

McCullough, A.J. The clinical features, diagnosis and nature history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2004; v8:521–33.

MacVicar, M.G., Winningham, M. L., Nickel, J. L. Effects of aerobic interval training on cancer patients functional capacity. *Nurs Res.* 1989; 38:348-351.

Marchal, J.A., Rodriguez-Serrano, F., Campos, J., Madeddu, R., Boulaiz, H., Martinez-Amat, A., et al. Differentiation: an encouraging approach to anticancer therapy. *Ital J Anat Embryol.* 2006;111:45-64.

Mathers, C.D, Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3:e442.

Matthew, S. W., Emily, M. S. Cancer prevention, aerobic capacity, and physical functioning in survivors related to physical activity: a recent review. *Cancer Management and Research.* 2010; 2:157-164.

McNeely, M.L., Campell, K.L., Rowe, B., Klassen, T.P., Mackey, J. R., Courneya, K. S. Effects of exercise on breast cancer patients and survivors: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ.* 2006; 175: 34-41.

McGlynn, K.A., London, W.T. The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. *Clin Liver Dis.* 2011;15 (2):223-43

McTiernan, A. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nature.* 2008. p205-2011

Mamasivayam, N. Chemoprevention in experimental animals. *Ann NY Acad Sci.* 2011; p60:71

Na, H.K., Oliynyk, S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Nutrition and Physical activity in Aging, Obesity, and Cancer.* 2011: 176-183.

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

Packer, L., Cadenas, E., Davies, K.J. Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic Biol Med.* Epub 2007; V.44 (2):123-5.

Paffenbarger, Jr.R.S., Hyde, R.T., Wing, A.L., Lee, I.M., Jung, D.L., Kampert, J.B. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl. J. Med.* 1993; 328(8):538-45.

Parkin D.M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2:533-43.

Parkin, D.M., Bray, F.I., Devesa, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 8:S4-66.

Pereira, M.A., Barnes, L. H., Rassman, V.L., Kelloff, G.V., Steele, V.E. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis.* 1994;15:1049-54.

- Piñeiro-Carreo, V.M.; Piñeiro, E.O. *Liver. Pediatrics*. 2004; v.113, n.4, p.1097-1106.
- Phillips, S.M., Tipton K.D., Aarsland, A., Wolf, S.E., Wolf, R.R. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol*. 1997; 273: E99–E107.
- Pitot, H.C. Animal models of neoplastic development. *Dev Biol (Basel)*. 2001;106:53-7; discussion 7-9, 143-60.
- Pitot, H.C.. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev. Pathol.*2007; v. 2: 1-29..
- Preston, R.J., Williams, G.M. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard. *Crit Rev Toxicol*. 2005;35:673-83.
- Progression Models in resistance Training for Healthy adults. Official Journal of the American college of Sports Medicine. 2009.
- Promrat, K., Kleiner, D.E., Niemeier, H.M., Jackvony, E., Kearns, M., Wands, J.R., Fava, J.L. & Wing, R.R. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010; v51:121-29.
- Ray, R.S., Ghosh, B., Rana, A., Chatterjee, M. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer*. 2007;120:13-23.
- Rega, G., Kaun, C., Demyanets, S., et al. Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin M in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo. *Arterioscler Thomb Vasc Biol*. 2007;v27:1587-95.
- Roberts, L.R., Gores, G.J. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis*. 2005; 25(2):212–225 Review
- Robbins, S.L., Cotran, R.S. *Bases Patológicas das Doenças*. 7ed. Rio de Janeiro: RJ, 2005.
- Rodrigues, M.A., de Camargo, J.L.V. Carcinogênese. In: Montenegro MR, Franco M, editors. *Patologia: Processos gerais*. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 223-40.
- Schmitz, K.H., Holtzman, J., Cournya, K.S., Mâ s se L.C., Duval, S., Kane, R. Controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:1588-95.
- Schoenberg, M.H., Halle, M. Physical activity in the prevention and treatment of colorectal carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(44): 722-7.
- Semple-Roberts, E., Hayes, M.A., Armstrong, D., Becker, R.A., Racz, W.J., Farber, E. Alternative methods of selecting hepatocellular nodules resistant to 2- acetylaminofluorene. *Int J Cancer*.1987; 40: 643–5.
- Steele, V.E., Lubet, R. A. The Use of animal models for cancer chemoprevention drug development. *Seminars in Oncology*. 2010; v.37(4): 327-338.

Tatematsu, M., Nagamine, Y., Farber, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res*; 1983; 43: 5049–58.

Vieira, V.J., Valentine, R.J., Wilund, K.R., Antao, N., Baynard, T., Woods, J.A. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications obese mice. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab*; 2009; 296: E1164–E1171.

Venturi, C., Zoppini, G., Zamboni, C., Muggeo, M. Insulin sensitivity and hepatic steatosis in obese subjects with normal glucose tolerance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* . 2004; v14: 200–204.

Ward, J.B. Jr, Henderson, R.E. Identification of needs in biomarker research. *Environ Health Perspect*. 1996;104 Suppl 5:895-900.

Waters, W.F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community Health*. 2001;26:79-92.

Wermore, C.M., Ulrich, C.M. in *Cancer Prevention and Management through Exercise and weight Control*. Mc Tiernan A. 2006. 157-175.

Winningham, M.,L., MacVicar, M.G. The effect of aerobic exercise on patient reports of nausea. *Oncol Nurs Forum*. 1989; 15:447-450.

Winningham, M.L. Walking program for people with cancer, *Getting started Cancer Nurs*. 1991; 14:270-276.

Winningham, M.L., MacVicar, M.G., Bondoc M. Effect of aerobic exercise on body weight and composition in patients with breast cancer on adjuvant chemotherapy. *Oncol Nurs Forum*. 1989; 16:683-689.

World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;12:366-70.

Capítulo II

Article

Modifying effects of swimming training on liver carcinogenesis in male Wistar rats fed a basal diet or high-fat diet.

Marco A. Aguiar e Silva¹, Ivan J. Vechetti Jr¹, Kelly S. Furtado², Luis F. Barbisan^{3*}

¹UNESP, Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Program of Post-Graduation in General and Applied Biology Program, Botucatu 18618-970, SP, Brazil.

²UNESP, Sao Paulo State University, School of Medicine, Department of Pathology, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

³UNESP, Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author

Luis Fernando Barbisan, PhD.

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

Telephone/Fax-simile: 55-14-38116264/ e-mail: barbisan@ibb.unesp.br

Abstract

Laboratory studies have shown that moderate aerobic exercise inhibit colon and mammary carcinogenesis in rodent bioassays, but no reports exists on their protective action in liver carcinogenesis. Thus, the present study aimed to investigate the beneficial effects of swimming training on the promotion/progression stages of rat liver carcinogenesis. Male Wistar rats were submitted to chemically-induced liver carcinogenesis and allocated into four major groups according their dietary regimen (16-week) and training 5 days/week (8-week): two groups were fed a basal diet (BD) and trained or not and two groups were fed a high-fat diet (HFD) and trained or not. At week 20, the animals were killed and liver samples were processed to histological analyses, immunohistochemical detection of persistent or remodeling preneoplastic lesions (pPNL and rPNL) expressing placental glutathione S-transferase (GST-P) enzyme, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cleaved caspase-3 and bcl-2 protein levels by western blotting or malonaldehyde (MDA) detection by HPLC. Overall analysis indicated that swimming training reduced the body weight and fat body in both BS and HFD groups, normalized total cholesterol levels in the HFD group and decreased the MDA levels and number of GST-P-positive pPNL and adenomas in BD group. Also, a favorable balance in PCNA, cleaved caspase-3 and bcl-2 levels was detected in the liver from BD-trained group in relation to BD-untrained group. The findings this study indicated that a moderate aerobic exercise protocol may attenuate liver carcinogenesis under an adequate dietary regimen with lowered fat intake.

Key words: Swimming training, rat liver carcinogenesis, high-fat diet and preneoplastic and neoplastic lesions.

Running title: Swimming training and liver carcinogenesis

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer worldwide, ranking third among all cancer-related mortalities in the world (El-Serag and Rudolph, 2007; Jemal et al., 2010). HCC arise from hepatocytes undergoing malignant transformation in response to various noxious chronic stimuli such as hepatitis B or C virus, aflatoxin B1 contamination, alcohol abuse and others (Farazi and DePinho, 2006; McGlynn and London, 2011). Survival remains poor in patients presenting intermediate and advanced stage HCC, because of the aggressiveness of lesions at the time of diagnosis, lack of curative therapy and high recurrence rate (Farazi and DePinho, 2006). Thus, it is important to develop more effective strategies for the prevention and quality of life for people affected with this malignance (Courneya, 2001, 2007).

Several rodent models have been used in the study of development and pathogenesis of HCC and have contributed to the current knowledge this liver disease (Heindryckx et al., 2009; Wu et al., 2010). The resistant hepatocyte (RH) model is one of the most classical for the study of the different steps of rat liver carcinogenesis (Farber and Rubin, 1991; Elhkim et al., 1992). In this model, diethylnitrosamine (DEN)-initiating agent induces single cells and small foci of putative initiated hepatocytes that are promoted with 2-acetylaminofluorene (2-AAF), associated with a 70% partial hepatectomy (PH) surgery (Farber and Rubin, 1991; Elhkim et al., 1992). 2-AAF is a mitoinhibitor to normal hepatocytes but does not inhibit a subpopulation of the glutathione S-transferase (GST-P) positive hepatocytes. Partial hepatectomy acts as a mitotic stimulus resulting in activation of hepatic stem cells (oval cells) and a rapid growth of the initiated cells subpopulation into larger GST-P-positive lesions. Some preneoplastic lesions (PNL) eventually progress into grossly visible nodules and, over months, HCC arise (Farber and Rubin, 1991). Thus, the RH model is a well-defined liver cancer model mimicking the human HCC development (Andersen et al., 2010).

Regular aerobic training has been suggested as an appropriate measure for the activation of antioxidant and immunological defenses, reduction of inflammatory processes and improves in

quality life mainly in metabolic syndrome diseases (Kuo et al. 2007, Packer et al., 2007). Some clinical studies have shown that physical activity increases the quality of life of patients with different types of cancer (Schmitz et al., 2005 and McNeely et al., 2006; Cramp et al., 2010). In chemically-induced carcinogenesis rat models, moderate physical exercise (running and swimming) reduces the development of preneoplastic and neoplastic lesions in the colon and mammary gland (Hoffman-Goetz, 2003; Na, 2011). However, no report exists on beneficial effects of regular physical exercise on promotion/progression stages of liver carcinogenesis.

Considering the beneficial effects to regular physical activity to health and quality of life, the present study aimed to investigate the modifying effects of swimming training on the promotion/progression stages of liver carcinogenesis in male Wistar rats fed a basal diet or high fat diet.

2. Material and Methods

2.1 Animal and experimental design

This study was approved by the Institute of Biosciences of Sao Paulo State University (UNESP) Ethics Committee for Animal Research (Protocol n°242). Four-week-old male Wistar rats were obtained from Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB, UNICAMP Campinas-SP, Brazil). The animals were housed in polypropylene cages (five animals/cage) covered with metallic grids in a room maintained at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 10\%$ humidity and with a 12-h light-dark cycle, during a 2-week acclimatization period. Then, all animals were submitted to the resistant hepatocyte (RH) model of hepatocarcinogenesis adapted to male Wistar rats (Moreno et al., 1991) with minor modifications. At the beginning of the experiment, animals received a single i.p. dose of 200 mg/kg b.w. of diethylnitrosamine (DEN, Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA) for initiation of liver carcinogenesis. After a recovery period of 2 weeks, the initiated hepatocytes were selected/promoted by five p.o doses of 2-acetylaminofluorene (2-AAF, Sigma-Aldrich Co., St. Louis Mo, USA). The first four doses (200 mg/kg b.w. p.o.) were administered on 4 consecutive days before a 70% partial hepatectomy (HP) procedure (Farber and Rubin, 1991; Elhkim et al., 1992). The remaining doses of 2-AAF (75 mg/kg b.w.) were administered on days 2 and 4 after the HP. Three weeks after HP, the animals were randomly allocated in to four groups (G1-G4), consisting of ten animals in each group (n=10). Then, groups G1 and G2 were fed either a basal diet (BD, 4% fat; RC Focus 1765, Agrocere®, Rio Claro, São Paulo, Brazil) and groups G3 and G4 fed a palatable high-fat diet (HFD, 20% fat; RC Focus 2413, 2414, 2415 and 2416, containing chocolate, cheese, bacon or vanilla flavorings, respectively, Agrocere®, Rio Claro, São Paulo, Brazil) for 16 weeks (Nascimento et al., 2011). Groups feeding HFD were submitted to cycles (i.e., seven days each) of hypercaloric pellet-dietary formulations with a different palatability to increase food intake. After 8 weeks of feeding on a BD or HFD, groups 3 and 4 were subjected to swimming training for a period of 8 weeks, consisting of swimming 5 days/week. The animals from Groups 3 and 4 performed individually a progressive aerobic training program in an aquarium of 110 x 70 X

22 cm, subdivided into five compartments, filled with 50cm of the water at 30 ± 2 °C. Before the initial training program, all the animals were adapted to the water. The adaptation consisted of keeping the animals in shallow water at 30 ± 2 °C for 5 days/week. The animals swam using washers as overload attached by a rubber band on their tails. Training volume and intensity were progressive: 10 min without overloading (1st week), 20 min, 1% overload (2nd week), 25, 30, 35, and 40 min, 3% overload (3rd week), 45, 50, 55, and 60 min, 3-5% overload (4th week) and 60 min, 3-5% overload (5th to 8th weeks) (Gobatto et al. 2001). According to Gobatto et al. (2001), 5% overload represents the maximal lactate steady state in rats. The overload training was calculated based on body weight data to ensure the same training intensity throughout the experiment, the animals were weighted daily. Groups 1 and 4 were kept in shallow water throughout the training period to reduce the stress in these animals. All training sessions were performed between 2 and 4 pm in a dark room.

2.2 Tissue processing, histology and immunohistochemical procedures

Immediately before necropsy, blood samples were collected and the serum levels of glucose, total cholesterol and triglycerides were measured spectrometrically (Ramaiah, 2007). At necropsy, the liver was removed and weighted, and representative samples were either fixed in 4% phosphate buffered formalin during 24 h for paraffin embedding or frozen in liquid nitrogen for Western blotting analysis. The paraffin blocks were cut into 5- μ m-thick sections and stained with hematoxylin–eosin (HE) for histological evaluation and immunohistochemical reaction for glutathione S-transferase placental form (GST-P) enzyme.

Preneoplastic lesions (PNL) and tumors were classified as altered foci of hepatocytes (AFH) showing clear/eosinophilic or basophilic cell types or hepatocellular adenoma (HA) or hepatocellular cell carcinoma (HCC), respectively, according to previously published criteria (Bannasch et al., 2003).

GST-P expression in the liver sections was immunohistochemically detected using a polymer system (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica/Novocastra). Briefly, histological liver sections were put on silanized coated slides, deparaffinized and rehydrated with graded alcohol. Then, the slides were treated with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline for 20 min, nonfat milk for 60 min, rabbit polyclonal anti-GST-P (Medical and Biological Laboratories Co., Tokyo, Japan, clone 311, 1:1000 dilution) antibody for 16h at 4°C, post-primary blocked for 30 min. and polymer for 30 min. Chromogen generation was achieved with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma–Aldrich Co., St. Louis MO, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris’s hematoxylin.

PNL expressing uniform (distinct borders) and non-uniform (indistinct borders) staining for GST-P were classified as the persistent and remodeling phenotypes, respectively, according to previously published criteria (Farber and Rubin, 1991; Imai et al., 1997).

2.3 Protein expression analysis.

Protein levels of PCNA, cleaved caspase-3, bcl-2 from liver samples were determined by Western Blot technique, using β -actin protein as a normalizer. Liver samples were homogenized in lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 μ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride - PMSF, 0.25 mM Na₃VO₄, NaCl 150 mM, and Tris-HCl 50 mM pH 7.5). The samples were centrifuged at 11,000 rpm for 20 min, and 50 μ L of homogenate fraction was re-suspended in 25 μ L of Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/mL bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M b-mercaptoethanol). An amount of 70 μ g of total protein was fractioned by one-dimensional SDS-PAGE gel (12%), stained with Coomassie blue, to confirm equal loading of each sample. Proteins were transferred from gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nonspecific binding sites were blocked using bovine serum albumin solution (BSA) 3% in phosphate-saline buffer (PBS-T:

NaH₂PO₄·H₂O 0,1 M, Na₂HPO₄·7H₂O 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,1% pH 7,4), for 10 minutes. Membranes were incubated with specific primary antibodies PCNA (1:200 dilution range), Bcl-2 (1:200), Caspase (1:500) and β-actin (1:100) diluted in BSA 1% solution for 10 minutes. The antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology California, USA (PCNA, Bcl-2 and β-actin) and Cell Signalling (Caspase-3). After 4 wash steps with PBS-T, membranes were incubated with specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, according to the primary antibodies used (1:2000 dilution range). Finally, after 4 wash steps, membranes were submitted to immunoreactive protein signals detected using *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), according manufacturer's instructions. Signals were captured in an immunoblotting film paper and the bands intensities were quantified using a densitometry analysis software (*Image J software for windows*, version 1.71, 2006, Austria).

2.4 Lipid peroxidation analysis.

Lipid peroxidation was assessed by levels of malonaldehyde (MDA), measured by HPLC. Approximately 1 g of liver was homogenised in phosphate buffer pH = 6.5, following a ratio of 1:5, was then centrifuged for 5 min at 3500 rpm. In 50 mL of sample was added 250 mL of phosphoric acid (1.22 mol L⁻¹), 450 mL of deionized water and 250 mL of thiobarbituric acid (0.67% - prepared in equal proportions in acetic acid and water). The reaction was then incubated for one hour in a water bath at 95 ° C and then cooled in an ice bath at 4 ° C (Brown et al., 1996). To 200 mL of sample was added to 360 mL of methanol and 40 mL of sodium hydroxide (1 mol. L⁻¹), after being filtered through Millipore coupled to the syringe, straight to Vail. The samples were chromatographed on ODS RP18 column VC-250 mm x 4.6 mm id with 25 mM phosphate buffer 50:50 (v / v) and pH 6.5. The methanol was the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The fluorimetric detection was performed with λ_{exc} 532nm and λ_{em} 553nm and using a detector model

RF-10AXL. The peak of the MDA-TBA adduct was calibrated with a standard solution processed PET equimolar amounts of MDA under the same conditions of preparation of the liver.

2.5 Statistical analysis

Body weight, food intake, relative liver weight, fat body, biochemical markers, GSTP-positive lesions and multiplicity of neoplastic lesion, PCNA, cleaved caspase-3 and bcl-2 protein levels were analyzed by ANOVA test or the Kruskal-Wallis test. The incidences of different types of PNL, HA were examined using χ^2 test or the Fischer exact test. Significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Jandel Sigma Stat Software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

3. Results

During the stage of progression of liver carcinogenesis in RH model, groups receiving high fat diet (G3 and G4) presented a slight reduction in body-weight mass (before and during exercise training) when compared to the respective control groups fed basal diet (G1 and G2). At the end of experimental period, the mean values of body weight from groups submitted to swimming training were lower than respective untrained groups fed basal diet or high fat, although without a significant difference (Table 1). Due to higher fat content, groups receiving high fat diet (G3 and G4) presented a significant reduction ($p < 0.001$) in food intake when compared to the groups receiving basal diet (G1 and G2) (Table 1). The mean values of relative liver weight were similar among the groups but fat body and total cholesterol was significantly diminished ($p < 0.05$) in groups fed high fat diet and submitted to swimming training (G4) when compared to their respective untrained group (G3).

Oxidative stress in the liver was evaluated by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker (Figure 1). Lipid hydroperoxide concentration did not differ between groups untrained and fed basal diet or high fat diet. However, a significant reduction ($p < 0.05$) in MDA levels was observed in group fed basal diet and submitted to swimming training when compared to their respective control group (G1), indicating attenuation in oxidative stress in the liver.

PCNA, cleaved caspase-3 and bcl-2 protein levels were analyzed in the liver by western blotting technique (Figure 2A-D). There was a significant reduction ($p < 0.05$) in PCNA protein levels in group fed basal diet and submitted to swimming training (G2) compared to their respective control (G1). Also, a significant reduction ($p < 0.001$) in bcl-2 protein levels, but also a significant increase ($p < 0.05$) in cleaved caspase-3 protein levels in groups submitted to swimming training (G2 and G4) were observed in relation to the respective groups untrained (G1 and G3).

After the histopathological analyses (Table 2), the main preneoplastic lesion (PNL) observed in carcinogens-treated groups was characterized by altered foci of hepatocytes (AFH) showing different types of clear/eosinophilic cell (most frequent PNL, Figure 3A) or basophilic cell phenotypes. Neoplastic lesions included hepatocellular adenomas (HA) showing eosinophilic cell phenotype (Figure 3B). The incidence of different types of PNL and HA did not differ among groups, but the mean number of HA per liver area was significantly reduced ($p < 0.02$) in group fed basal diet and submitted to swimming training (G2) when compared to the respective control untrained group (G1) ($p < 0.05$).

4. Discussion

The results indicated that promotion/progression stages of liver carcinogenesis were successively obtained herein due to rapid and synchronized development of preneoplastic and neoplastic lesions in resistant hepatocyte (RH) model used. A hepatoprotective action of swimming training was well characterized by body weight and fat body loss in the BS and HFD groups, normalized total cholesterol levels in the HFD group and decreased the MDA levels and number of GST-P-positive pPNL and adenomas in BD group. Also, a favorable balance in PCNA, cleaved caspase-3 and bcl-2 levels was detected in the liver from BD-trained group in relation to BD-untrained group.

Some studies have shown that high-fat feeding regimens induce obesity, insulin resistance, dyslipidemia, cardiovascular changes and nonalcoholic fatty liver disease in rat laboratory (Young and Kirkland, 2007; Ahmed et al., 2009). Moreover, the most hepatic deleterious effects of high-fat dietary regimen have been assessed using nonalcoholic steatohepatitis (NASH) liquid diets or lipogenic methionine choline-deficient diet (Wang et al., 2008, 2009; de Lima et al., 2008; Ahmed et al., 2009; Wu et al., 2010). These dietary regimens induce steatohepatitis without a significant increment in body mass or in elevation of serum levels in total cholesterol or triglycerides (Wang et al., 2008, 2009; de Lima et al., 2008; Ahmed et al., 2009; Wu et al., 2010). The same high-fat diet used in this study was effective in promoting obesity in male Wistar rats which was demonstrated by an increased adiposity index in association with a higher body weight (Nascimento et al., 2011). In contrast, male Wistar rats initiated/promoted for liver carcinogenesis and fed a 16-week high-fat diet presented lowered body weight in relation to BD group but with a slight increase of cholesterol and fat body. These results opposites in body weight gain could be associated with differences in physiology, metabolism and disease status.

Chemically-induced hepatocarcinogenesis is a multi-step process that has been well documented by morphological, biochemical and genetic changes in the liver rat (Bannasch et al.,

2003; De Miglio et al., 2003; Pitot, 2007). After the DNA-damaging event that initiates the carcinogenesis process, surrogate preneoplastic lesions (PNL) appear and, depending on the treatment or time, may be followed by benign tumors (adenomas), and eventually by HCC (Bannasch et al., 2003; Pitot, 2007). A typical feature of PNL in RH model is their capability of expressing one of two options under genetic control: spontaneously remodeling to a normal appearing liver by the majority (95–98%) or persistence with cell proliferation and evolution to cancer by a small minority (2–5%) (Farber and Rubin, 1991; Imai et al., 1997). Persistence of PNLs could indicate a block in remodeling with increase of cell proliferation, by loss of differentiation or increase of apoptosis and appears to be linked to enhanced evolution of hepatocellular carcinoma (Imai et al., 1997; De Miglio et al 2003; Mazzantini et al., 2008). The present study demonstrated that swimming training reduced the number of larger PNL (persistent and remodeling) but mainly the number of persistent GST-P positive PNL in rat fed a basal diet. Taken together, these data show that swimming training associated with a dietary regimen with lowered fat intake has a selective effect on the expansion of persistent PNL, which are thought to be precursors of HCC.

Cell proliferation and apoptosis balance play an important role during the progression of rat liver carcinogenesis (Pitot, 2007). Proliferating cell nuclear antigen, a co-factor for DNA-polymerase-delta leading to DNA replication and DNA damage repair, has been considered a feasible marker for cell proliferation (Iatropoulos and Williams, 1996). Apoptosis is an event cellular death that occur under both physiological and pathological conditions and regulated by numerous modulators including Bcl-2 family and caspases (Kuwana and Newmeyer 2003; Brunelle and Letai 2009; Ulukaya et al., 2011). Bcl-2 family members are pivotal in the regulatory processes that either repress (e.g., bcl-2 and bcl-x1) or induce (e.g., bak, bax, and bad) apoptosis or programmed cellular death (Kuwana and Newmeyer 2003; Brunelle and Letai 2009; Ulukaya et al., 2011). The caspases are a family of cysteine proteases that function as central regulators of cell death (Ulukaya et al., 2011). Some caspases are known as initiator caspases (caspase 2, 8, 9 and 10) whereas the others are effector caspases (caspase 3, 6 and 7) (Ulukaya et al., 2011). The results of

western blotting suggest that regular and moderate swimming training reduced the bcl-2 and PCNA levels and increased cleaved caspase-3 in the liver from group feeding basal diet. In contrast, in the liver from group trained and feeding high fat diet only bcl-2 and cleaved caspase-3 levels were changed by exercise. Therefore, the protective effect of swimming training in rat feeding basal diet could be due to a favorable balance in PCNA, cleaved caspase-3 and bcl-2 levels. Thus, the cell proliferation levels rather than apoptosis constitute the probably major determinant for progression of liver carcinogenesis.

Oxidative stress is potentially deleterious to cells and tissues and associated with the progression of many diseases, including experimental and human liver carcinogenesis in rodent and human (Sánchez-pérez et al., 2006; Sasaki, 2006). In general, the eukaryotic cells are continuously attacked by reactive oxygen species (ROS), which arise by endogenous pathways (i.e., mitochondrial and P450 metabolism, degenerative or inflammatory diseases, etc) as well as by exogenous pathways (i.e., exhaustive exercise, radiation, ozone, pollutants, etc) (Hwang and Kim, 2007; Ziech et al., 2011). The oxidative DNA damages induced by ROS may induce DNA base modifications, single- and double-strand breaks and the formation of apurinic/aprimidinic lesions, resulting in mutations and genomic instability when they are not accurately repaired (Hwang and Kim, 2007; Ziech et al., 2011). Physical exercise and training can have positive or negative effects on oxidative stress depending on training load, training specificity and the basal level of training (Kiran et al., 2004; Finaud et al., 2006). The results of the malondialdehyde (MDA) analysis, that reflect lipid peroxidation status, indicate that moderate swimming training reduced lipid peroxidation in the liver from group fed a basal diet, characterizing a protective effect in a dietary regimen with lowered fat intake.

In summary, the present study showed that the moderate swimming training protocol may attenuate liver carcinogenesis under an adequate dietary regimen with lowered fat intake. Also, the

exercise regimen takes to body mass loss, adiposity and improved serum cholesterol in high-fat feeding regimen.

Acknowledgments

The study was supported by Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP DFP- 0028610). Marco A. Aguiar e Silva and Luis F Barbisan were recipients of fellowships from FAPESP (2010/03056-9) and CNPq (), respectively.

Table 1 – Effects of swimming training on general and biochemical parameters evaluated in male Wistar rats fed a basal diet (BD) or palatable high-fat diet (HFD).¹

Parameters	DEN/2-AAF ²			
	BD/untrained (n=10)	BD/Trained (n=10)	HFD/untrained (n=10)	HFD/Trained (n=10)
General				
Body-weight ³ at weak 5(g)	380.4 ± 9.33	382.0 ± 8.58	380.1 ± 5.57	380.4 ± 9.04
Body-weight at weak 13 (g)	447.7 ± 11.84	458.1 ± 12.57	419.2 ± 10.13	420.6 ± 14.88
Body-weight at weak 22 (g)	470.3 ± 15.3	421.1 ± 15.4*	414.4 ± 10.5*	381.7 ± 22.5*,**
Food consumption (g/rat/day) ⁴	24.59 ± 3.10	23.25 ± 5.71	16.86 ± 5.26*	18.89 ± 5.03*
Fat body (%) ⁵	4.91 ± 0.26	3.96 ± 0.36*	5.91 ± 0.14*	4.30 ± 0.38**
Relative liver weight (%)	2.81 ± 0.23	2.85 ± 0.21	2.90 ± 0.13	2.91 ± 0.21
Biochemical data				
Glucose (mg/dL)	147.32 ± 6.75	138.28 ± 10.43	153.53 ± 6.33	156.01 ± 9.35
Triglycerides (mg/dL)	48.41 ± 4.26	47.40 ± 9.53	59.65 ± 8.01	51.12 ± 5.67
Cholesterol (mg/dL)	72.70 ± 5.16	65.89 ± 7.49	93.53 ± 7.34*	72.18 ± 5.01**

¹Data are mean ± SEM; ²DEN/2AAAF= diethylnitrosamine and 2-acetaminofluorene hepatocarcinogens, BS= Basal diet, HFB= high fat diet; ³Week 5, 13 and 22 represent HFD introduction, exercise introduction and sacrifice, respectively; ⁴ HFD introduction; ⁵Abdominal, retroperitoneal and epididymal white adipose tissues. *, ** Different from groups G1 or G3 group, respectively, 0.05 < p < 0.001.

Table 2 – Effects of swimming training on histopathology and development of GST-P-positive PNL evaluated in male Wistar rats fed a basal diet (BD) or palatable high-fat diet (HFD).¹

Parameters	DEN/2-AAF ²			
	BD/untrained (n=10)	BD/Trained (n=10)	HFD/untrained (n=10)	HFD/Trained (n=10)
HE analysis³				
PNL (incidence)	100%	100%	100%	100%
HA (incidence) (multiplicity) ⁴	70% (1.2 ± 0.3)	40% (0.3 ± 0.2)*	80% (1.6 ± 0.3)	70% (0.9 ± 0.23)
GST-P analysis (number/cm²)				
pPNL ⁵	12.46 ± 1.50	4.84 ± 1.08*	13.40 ± 2.41	10.96 ± 1.90
rPNL	18.13 ± 3.14	17.21 ± 8.18	19.73 ± 3.57	17.69 ± 2.74
tPNL (diameter 0.2 to < 1.1 mm)	24.01 ± 3.64	19.30 ± 4.94	31.71 ± 5.37	26.02 ± 4.83
tPNL (diameter 1.2 to 2.1 mm)	7.91 ± 1.13	3.45 ± 0.95*	8.89 ± 1.10	6.25 ± 1.30

¹Data are in percent or mean ± SEM; ²DEN/2AAF= diethylnitrosamine and 2-acetaminofluorene hepatocarcinogens, BS= Basal diet, HFD= high fat diet; ³PNL= Preneoplastic lesion, HA= Hepatocellular adenoma; ⁴Multiplicity= mean number of HA; ⁵pPNL= Persistent preneoplastic lesion, rPNL= remodeling preneoplastic lesion and tPNL= total pPNL + rPNL.* Different from groups G1, 0.05 < p < 0.02.

Legend for Figures

Figure 1- Lipid peroxidation analysis using malonaldehyde levels ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue) in the liver from different groups. BS= Basal diet, HFD= high fat diet, NT= untrained animals and T= Trained animals. Values are mean \pm SEM.

* Different from G1, $p < 0.05$.

Figure 2- A) Representative immunoblots of PCNA (34 kDa), cleaved caspase-3 (17/19 kDa), bcl-2 (28 kDa) and β -actin (43 kDa) assayed by Western blotting. B-D) Data from (mean \pm SEM) IOD calculated from the ratio of PCNA, cleaved caspase-3 and bcl-2 to β -actin levels for the different groups. Values are mean \pm SEM.

* Different from G1 and G3, < 0.05 $p < 0.001$.

Figure 3- A-B) Persistent and remodeling glutathione S-transferase (GST-P)-positive preneoplastic lesions (PNL) (20x objective) in a immunohistochemically-stained liver section, respectively; C-D) Preneoplastic lesion (arrows, objective 20x) and hepatocellular adenoma (arrows, 4x objective) in a HE-stained liver section, respectively;

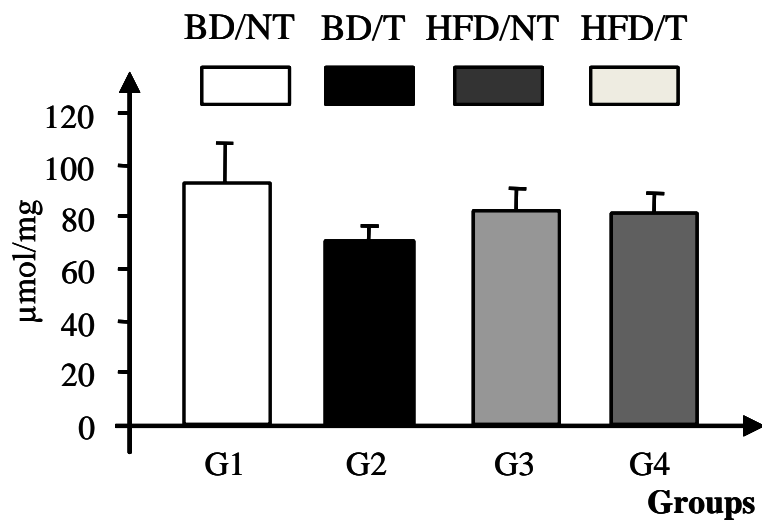


Figure 1

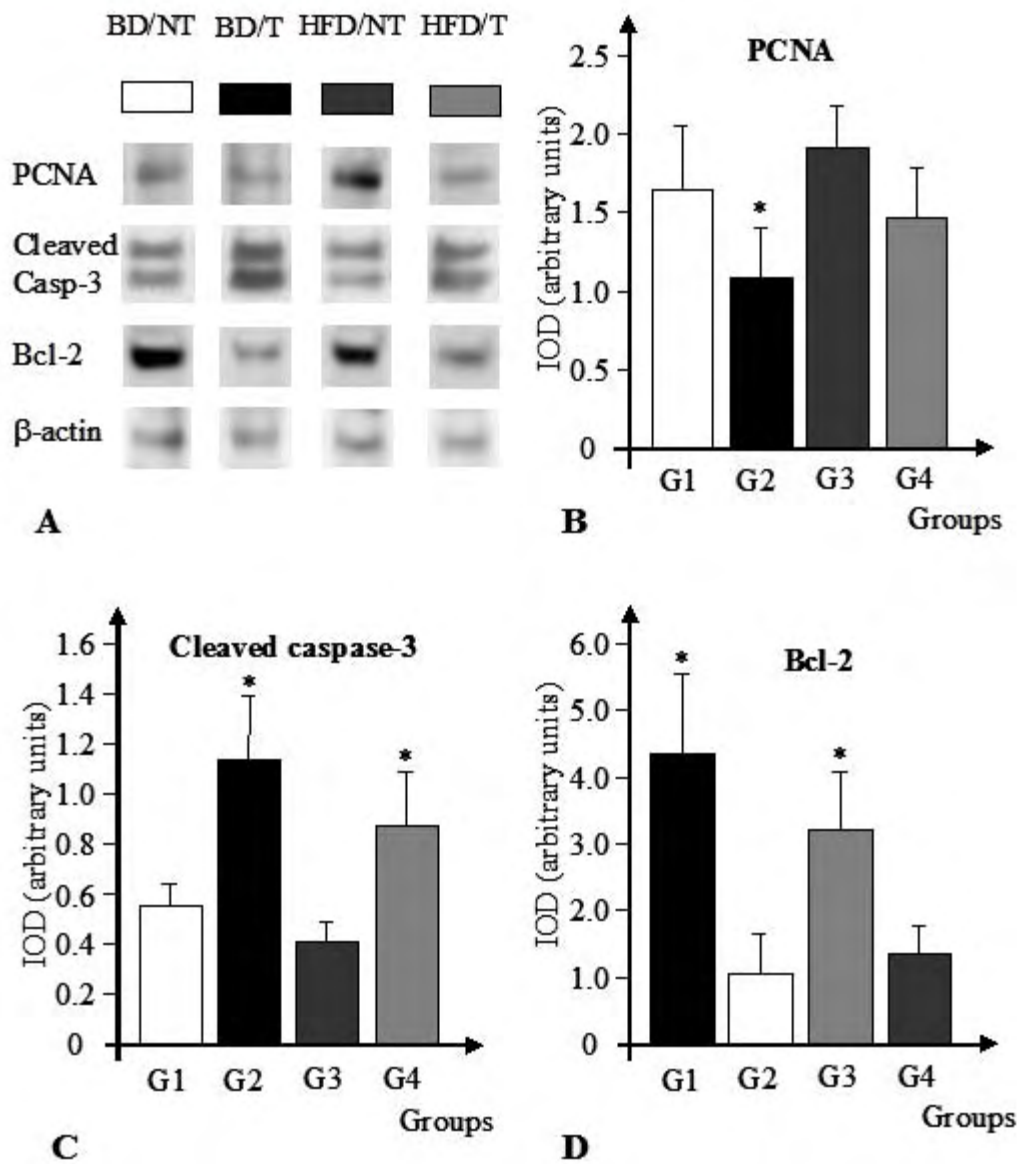


Figure 2

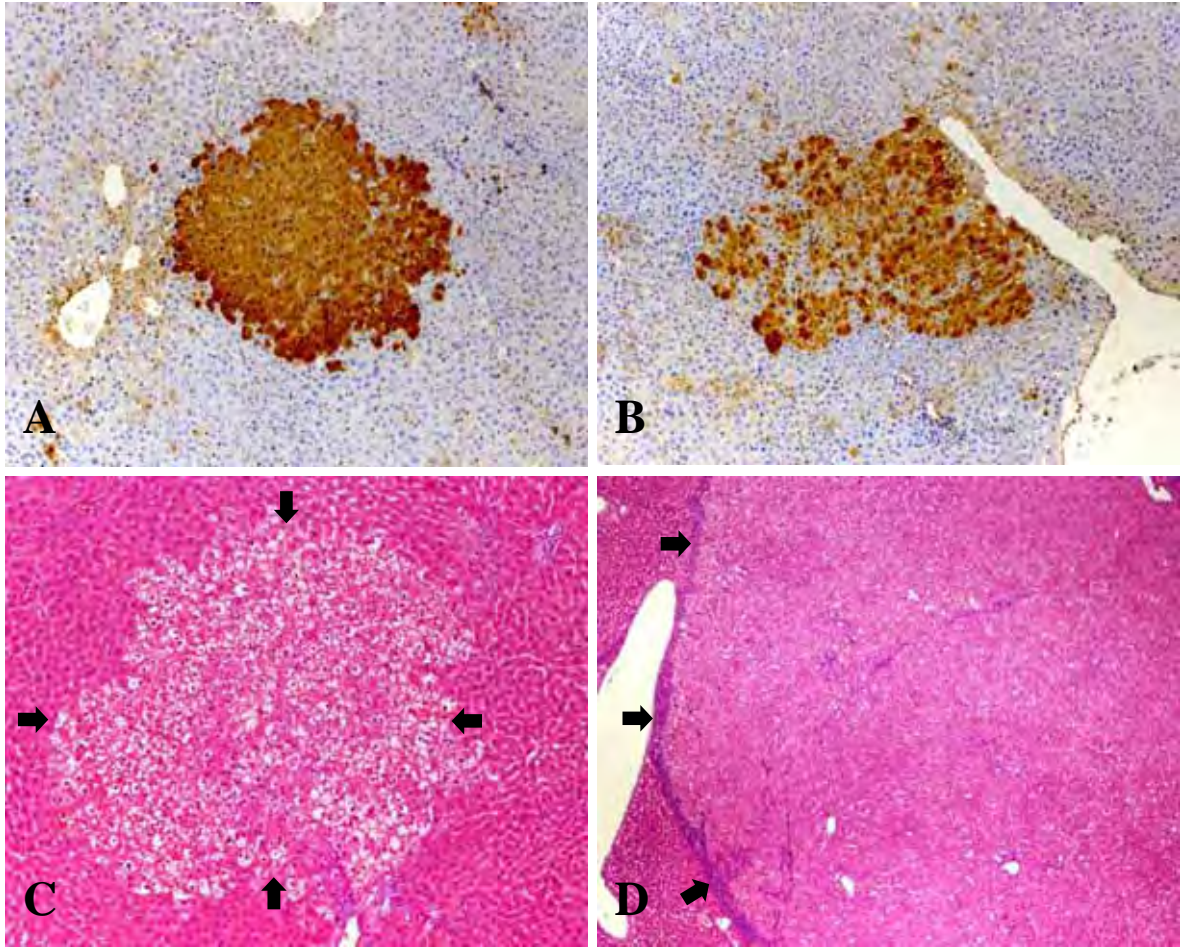


Figure 3

5. References:

- Ahmed, U., Redgrave, T. G., Philip, S. O. Effect of dietary to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J.Gastr.Hepatol.* 2009; 1463-71.
- Andersen, J. B., Loi, R., Perra, A., Factor, V. M., Ledda-Columbano, G. M., Columbano, A., Thorgeirsson, S. S. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. *Hepatology.* 2010; 51(4): 1401-9.
- Bannasch, P., Haertel, T., Su, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risc identification and early detection of neoplasia. *Toxicol. Pathol.* 2003; 31(1): 134-9 Review.
- Brunelle, J. K., Letai, A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009; 122(pt 4): 437-41. Review.
- Courneya, K.S. Exercise interventions during cancer treatment biopsychocial outcomes. *Exerc. Sport. Sci. rev.* 2001; 29(2): 60-64.
- Cournya, K. S., Segal, R. J., Mackey, J. R., Gelmon, K., Reid, R. D., Friedenreich, C. M, et al: Effects of aerobic and resistance exercise in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2007; 25:4396-4404.
- Cramp, F., James, A., Lambert, J. The effects of resistance training on quality of life in cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Support Care Cancer.* 2010; 18:1367-1376.
- De Lima, V. M., Oliveira, C. P., Alves, V. A., Chammas, M. C., Oliveira, E. P., Stefano, J. T., de Mello, E. S., Cerri, G. G., Carrilho, F. J., Caldwell, S. H. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2008; 49(6): 1055-61.
- De Miglio, M. R., Simile, M. M., Calvisi, D. F., Virdis, P., Asara, G., Frau, M., Bosinco, G. M., Seddaiu, M. A., Daino, L., Feo, f., Pascale, R. M. Phenotypic Reversion of rat neoplastic liver is under genetic control. *Int. J. Cancer.* 2003; 105(1): 70-5.

Elhkim, O. M., Decloitre, F., Loridon-Rosa, B., Frayssinet, C. Role of diethylnitrosamine, 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy in the expression. Of glutathione-S-transferase-P and gamma-glutamyltranspeptidase in the early steps of rat liver carcinogenesis. 1992; 13(3):152-62.

El-serag, H.B., Lenhard Rudolph, K. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007; p132:2557–2576.

Farazi, P. A., DePinho, R. A. The genetic and environmental basis of hepatocellular carcinoma. *Discov. Med*. 2006; 6(35): 182-6. Review.

Farber, E., Rubin, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res*. 1991; 51(11)? 2751-61. Review.

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. Oxidative Stress: Relationship With Exercise And Training. *Sports Medicine*. 2006; 36(4): 327-358.

Gobatto, C.A. , de Mello, M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v.130: 21-7, 2001.

Heindrychx, F., Colle, I., Van Vlierberghe, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Pathol*. 2009; 90(4): 367-86. Review.

Hoffman-Goetz, L. Physical activity and cancer prevention: animal models. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35(11)? 1828-33. Review.

Hwang, E. S., Kim, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vivo and in vivo cancer research. *Toxicology*. 2007; 1-10.

Iatropoulos, M. J., Williams, G. M. Proliferation Markers. *Exp. Toxicol. Pathol*. 1996; 48(23-3): 175-81.

Imai, T., Ichinose, M., Yanai, T., Masegi, t., Nakamura, t., Tsukamoto, T., Kitoh, K., Tatematsu, M. Sparse distribution of hepatocyte growth factor-producing cells inside hepatocellular foci in rats treated with hepatocarcinogens. *Jpn. J. Cancer Res*. 1997; 88(7): 615-8.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:277-300.

Kiran, R. T., Subramanian, M. V., Asha, D. S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp. Biomchem. Physiol. B. Biomchem. Mol.* 2004; 137(2): 187-96.

Kuo, H.K., Yen, C.J., Chen, J.H. et al. Association of cardiorespiratory fitness and levels of C-reactive protein: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Am. J. Cardiology*, v. 114: 28-33, 2007.

Kuwana, T., Newmeyer, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(6): 691-9. Review.

Mazzantini, R. P., de Conti, A., Moreno, F. S. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF-kappaB Pathways. *J Cell Biochem.* 2008; 103(2): 538-46.

McGlynn, K.A., London, W.T. The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. *Clin Liver Dis.* 2011;15 (2):223-43.

McNeely, M.L., Campell, K.L., Rowe, B., Klassen, T.P., Mackey, J. R., Courneya, K. S. Effects of exercise on breast cancer patients and survivors: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ.* 2006; 175: 34-41.

Moreno, F. S., Rizzi, M. B., Dagli, M. L., Penteado, M. V. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis.* 1991; 12(10): 1817-22.

Na, H.K., Oliynyk, S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Nutrition and Physical activity in Aging, Obesity, and Cancer.* 2011: 176-183.

Nascimento, A. F., Luvizotto, R. A., Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Seiva, F. R., Justulin, L. A. Jr., Silva, M. D., Okoshi, K., Wang, X. D., Ciconha, A. C. Long-term high-fat diet-

induced obesity decreases the cardiac leptina receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci.* 2011; 88(23-24): 1031-8.

Packer, L., Cadenas, E., Davies, K.J. Free radicals and exercise: an introduction. *Free Radic Biol Med.* v.44(2):123-5 Epub 2007.

Pitot, H.C.. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev. Pathol.*2007; v. 2: 1-29.

Ramaiah, S. K., A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food chem toxicol.* 2007; 45(9): 1551-7. Review.

Sánchez-Pères, Y., Carrasco-Legleu, C., García-Cuellar, c., Pérez-Carreón, J., Hernández-García, S., stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 2005; 217(1): 25-32.

Sasaki, Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J. Gastr.* 2006; 41:1135-1148.

Schmitz, K.H., Holtzaman, J., Cournya, K.S., Mâ s se L.C., Duval, S., Kane, R. Controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analisis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:1588-95.

Tatematsu, M., Nagamine, Y., Farber, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res;* 1983; 43: 5049–58.

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology. *Cell Biochem Finct.* 2011; 29(6)? 468-80.

Wang, Y., Ausman, L. M., Greeberg, A. S., Russell, R. M., Wang, X. D. Nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet promotes diethylnitrosamine-initiated early hepatocarcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer.* 2009; 124, 540-46.

Wang, y., Ausman, L. M., Russell, R. M., Greenberg, A. S., Wang, X. D. Increased Apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatothpatitis in rats is associated with c-jun NH2- terminal kinase activation and elevated proapoptotic bax. *J. of Nutr.* 2008; 138: 1866-1871.

Wu, T. C., Chen, L. K., Tsai, S. H., Liaw, Y. H., Hwang, B. Hepatic steatosis: An experimental model for quantification. *Archives Gerontol. Geriatr.* 2010.

Young, G. S., Kirland, J. B. Rat models of caloric intake and activity: relationships to animal physiology and human health. *Appl Physiol. Nutr. Metab.* 2007; 32:161-176.

Ziech, D., Franco, r., Pappa, A., Panayiotidis, M. I. Reactive oxygen species (ROS) induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011; 711(1-2): 167-73.

Review.