

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

GILMAR DIAS DA SILVA JÚNIOR

**EFEITO DE UMA SESSÃO DE TREINAMENTO COMBINADO
REALIZADO ANTES DO TRATAMENTO NA EXPRESSÃO DE
C-MIRNAS RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Bragança Paulista
2024

GILMAR DIAS DA SILVA JÚNIOR – R.A. 202327402

**EFEITO DE UMA SESSÃO DE TREINAMENTO COMBINADO
REALIZADO ANTES DO TRATAMENTO NA EXPRESSÃO DE
C-MIRNAS RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Miguel S. Conceição

Bragança Paulista
2024

WP 870
S58e

Silva Júnior, Gilmar Dias da

Efeito de uma sessão de treinamento combinado realizado antes do tratamento na expressão de c-mirnas relacionados à inflamação em mulheres com câncer de mama / Gilmar Dias da Silva Júnior. -- Bragança Paulista, 2024.

98 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Miguel Soares Conceição.

1. Neoplasias da mama.
2. Exercício físico.
3. MicroRNA circulante.
4. Vesículas extracelulares.
5. Inflamação. I. Conceição, Miguel Soares. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÚNIOR, Gilmar Dias Da Silva. “Efeito de uma sessão de treinamento combinado realizado antes do tratamento na expressão de c-mirnas relacionados à inflamação em mulheres com câncer de mama”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 16 de dezembro de 2024 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof(a). Dr(a). Miguel Soares Conceição - Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Andréia de Melo Porcari
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Murilo Vieira Geraldo
Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, rendo minha mais profunda gratidão às duas pessoas que são a razão da minha existência e formação: meus pais. À minha mãe, Vanilda, ofereço um agradecimento que transcende palavras, por seu amor incondicional, pelos ensinamentos que moldaram meu caráter e pela firmeza com que guiou meus passos. Foi ela quem me ensinou a magia das palavras, a paixão pelos livros, o encanto nas canções de Chico Buarque, os primeiros contatos com a arte de cozinhar, e o prazer e a importância de realizar exercícios físicos. Com ela, aprendi o valor da dedicação e do cuidado em cada detalhe da vida. Ao meu pai, Gilmar, sou grato por ter me legado não apenas seu nome, mas também virtudes que admiro profundamente: honestidade, paciência e o dom de ser organizado. Foi ele quem me mostrou a simplicidade encantadora de pedalar, o prazer de dirigir, a paixão pelos filmes e o fascínio pelos instrumentos musicais. Ambos, com sua inteligência e generosidade, foram os arquitetos do alicerce que sustenta tudo o que sou hoje.

Seguindo o fio da memória, chego aos meus avós, esses que muitos chamam de “segundos pais”, e que para mim sempre foram fundamentais. Tive o privilégio inestimável de crescer cercado por quatro figuras singulares que continuam a aquecer minha alma com suas histórias e presença. Ao avô Manuel, agradeço por ensinar-me a dignidade de ser incansável no trabalho e a beleza de fazer o bem ao próximo. À avó Eunice, sou grato pelas refeições que ainda vivem na minha memória, pelas risadas e pelas histórias que trazem o sabor de Minas. Ao avô Francisco (*in memoriam*), o querido "seu Chico", agradeço por me levar em suas jornadas pelo IEL/Unicamp, onde aprendi, em seus gestos, a força do orgulho de um avô. E à avó Gildete, agradeço por ser aquela que me mimou com um amor tão doce e completo que eu não hesito em dizer: é uma das melhores pessoas que já conheci.

Minha gratidão também se estende ao companheiro da minha jornada nos últimos 15 anos, Guilherme. Primeiro, como amigo insubstituível; depois, como o amor da minha vida. A ele, agradeço por ser meu alicerce, por compartilhar comigo os momentos mais simples e os mais grandiosos: as partidas de jogos de tabuleiro, as discussões literárias, as delícias à mesa, os filmes, as séries e, sobretudo, o desejo de construir uma vida juntos. Dizem que, com o tempo, nos tornamos reflexo daqueles que amamos. Se isso é verdade, tenho orgulho de refletir um pouco de quem ele é.

No campo acadêmico, agradeço ao Prof. Miguel, que me abriu as portas da pós-graduação com um projeto desafiador e transformador. Suas orientações, as discussões intensas e as risadas do dia a dia no laboratório marcaram profundamente minha formação. É uma honra ser parte da construção de seu laboratório, o Centro de Estudos em Exercício e Oncologia (CEEEO), e caminhar ao seu lado nesse início de sua brilhante trajetória como orientador.

Aos meus colegas do CEEEO e grupo de pesquisa, devo minha gratidão pela troca constante de aprendizado e apoio. Em especial, ao Cassaro, por seu humor contagiante e disposição em transformar cada dia em algo mais leve, além de excelentes discussões científicas. Ao Guilherme Telles, meu reconhecimento pela paciência e dedicação em me orientar nos desafios de bancada, assumindo, de maneira quase oficial, o papel de coorientador. À Marina e Olívia pelas ótimas contribuições em nossos projetos e pelas conversas sempre agradáveis. A todos os membros do grupo, muito obrigado por fazerem parte dessa jornada.

À Prof.^a Mara Patrícia, que desde meus primeiros passos na graduação foi minha mentora e porto seguro, meu mais sincero agradecimento. Sua confiança e incentivo moldaram não apenas minha carreira acadêmica, mas também minha visão de futuro.

Por fim, agradeço a todos os colaboradores, cientistas, membros de bancas e revisores que contribuíram para este trabalho, bem como à Universidade São Francisco, que ofereceu estrutura e suporte para este projeto, e à Unicamp, especialmente ao Caism, CEMICAMP e ao LABE, por viabilizar a pesquisa e os experimentos de bancada.

Às agências de fomento FAPESP, pelo apoio crucial por meio do processo 2023/02398-3, e à CAPES, pela contribuição à minha formação acadêmica, vai também minha gratidão.

Se esta dissertação é, em sua essência, uma colcha de retalhos tecida por muitas mãos, cada linha aqui escrita é um reflexo da generosidade, da sabedoria e do amor daqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para este momento.

*“O método científico é comprovado e verdadeiro.
Não é perfeito, é apenas o melhor que temos.”*

- Carl Sagan

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente no mundo, com alta mortalidade e morbidade. Associado frequentemente à inflamação crônica, esse tipo de câncer é influenciado por fatores como estilo de vida e inatividade física. Estudos apontam que o treinamento físico, em especial o treinamento combinado (TC), que integra exercícios aeróbios e de força, pode promover adaptações positivas, incluindo a redução da inflamação e a modulação do microambiente tumoral. As vesículas extracelulares (VEs) e os microRNAs (miRNAs) encapsulados são mediadores importantes desses efeitos, regulando processos celulares e comunicação intercelular. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de uma única sessão de TC na expressão de miRNAs circulantes (c-miRNAs) encapsulados em VEs, associados à inflamação, em mulheres com câncer de mama antes do início do tratamento oncológico. O estudo incluiu 12 mulheres diagnosticadas com câncer de mama (estágios I-III) que realizaram uma sessão de TC. Amostras de sangue foram coletadas antes e após o exercício. As VEs foram quantificadas por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) e Sensoriamento por Imagem Interferométrica de Partícula Única (SP-IRS). A expressão de c-miRNAs foi avaliada por sequenciamento de RNA, e análises bioinformáticas identificaram vias moleculares relacionadas. Como resultados, a concentração de VEs aumentou significativamente após o TC, conforme análise por NTA, enquanto o SP-IRS não detectou mudanças significativas. Foram identificados 330 miRNAs, dos quais 212 estavam presentes antes e após o exercício, e 88 eram exclusivos de cada momento. O treinamento resultou em alterações na expressão de miRNAs, com miR-543, miR-126-5p e let-7b-3p significativamente *up*-regulados e miR-381-3p e miR-148a-5p *down*-regulados. Esses miRNAs foram associados a vias relacionadas à inflamação, como sinalização de citocinas, e ao desenvolvimento tumoral, incluindo EGFR, FGFR e quimiocinas. De fato, a modulação dos c-miRNAs após o TC reforça seu papel no controle da inflamação e potencial supressão tumoral. A regulação de miRNAs como miR-19a-3p e miR-146a-5p sugere efeitos benéficos em vias oncológicas. Diferenças entre NTA e SP-IRS indicam a necessidade de métodos mais precisos para caracterizar VEs. Além disso, o impacto de miRNAs específicos destaca o TC como uma intervenção promissora para influenciar positivamente o microambiente tumoral antes do tratamento. Portanto, uma sessão de TC modula a expressão de c-miRNAs encapsulados em VEs, impactando vias inflamatórias e relacionadas ao câncer. Estes achados abrem novas perspectivas para o uso do treinamento físico como estratégia terapêutica no manejo de mulheres com câncer de mama. Estudos futuros devem explorar protocolos de TC mais extensos para confirmar e ampliar esses benefícios.

Palavras-chave: Neoplasias de mama. Exercício físico. MicroRNA circulante. Vesículas extracelulares. Inflamação.

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent cancer worldwide, associated with significant mortality and morbidity. Chronic inflammation, lifestyle factors, and physical inactivity contribute to its development. Studies suggest that physical exercise, particularly Combined Training (CT), which combines aerobic and resistance exercises, can reduce inflammation and modulate the tumor microenvironment. Extracellular vesicles (EVs) and encapsulated microRNAs (miRNAs) are critical mediators of these effects, regulating cellular processes and intercellular communication. Therefore, the objective of this work was to evaluate the impact of a single CT session on the expression of circulating miRNAs (c-miRNAs) associated with inflammation and encapsulated in EVs, in women with breast cancer prior to oncological treatment. Twelve women with breast cancer (stages I-III) participated in the study and performed a CT session. Blood samples were collected before and after exercise. EVs were quantified using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and Single Particle Interferometric Reflectance Imaging Sensor (SP-IRS). miRNA expression was analyzed through RNA sequencing, followed by bioinformatics to identify associated molecular pathways. As results, NTA analysis showed a significant increase in EV concentration after CT, although SP-IRS did not detect significant changes. A total of 330 miRNAs were identified, with 212 expressed at both time points and 88 exclusives to each time point. Differential expression analysis revealed that miR-543, miR-126-5p, and let-7b-3p were significantly up-regulated, while miR-381-3p and miR-148a-5p were down-regulated after CT. These miRNAs were associated with pathways involving inflammation, cytokine signaling, and tumor development, including EGFR, FGFR, and chemokines. In fact, the modulation of c-miRNAs after CT highlights their role in controlling inflammation and potentially suppressing tumor progression. Specific miRNAs, such as miR-19a-3p and miR-146a-5p, demonstrated beneficial impacts on oncological pathways. Differences between NTA and SP-IRS emphasize the need for more precise methods to characterize EVs. These findings suggest that CT is a promising intervention to positively influence the tumor microenvironment before treatment. Therefore, a single CT session modulates the expression of EV-encapsulated c-miRNAs, impacting inflammatory and oncological pathways. These findings pave the way for using physical training as a therapeutic strategy for managing women with breast cancer. Future studies should investigate extended CT protocols to validate and expand these benefits.

Keywords: Breast cancer. Physical exercise. Circulating microRNA. Extracellular vesicles. Inflammation.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

1-RM: Uma Repetição Máxima

AGO2: Argonauta-2

Akt: Proteína Quinase B

ALIX: Esta sigla geralmente se refere a uma proteína envolvida no processo de formação de vesículas. O nome completo geralmente é ALG-2-interacting protein X.

BIRC2: Gene que codifica uma proteína inibidora de apoptose.

BRCA1/2: Genes supressores de tumor de mama 1 e 2 (do inglês, *Breast cancer gene 1/2*)

Caism: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CCL22: Quimiocina (C-C motif) ligante 22

CCL3: Quimiocina (C-C motif) ligante 3

CCL5: Quimiocina (C-C motif) ligante 5

CD40/CD40L: Família de proteínas de membrana envolvidas na ativação do sistema imune.

CEEO: Centro de Estudos em Exercício e Oncologia

c-miRNAs: miRNAs circulantes

CXCL12: Quimiocina (C-X-C motif) ligante 12

CXCL2: Quimiocina (C-X-C motif) ligante 2

CXCR4: Receptor de quimiocina (C-X-C motif) 4

DAB: 3'-diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Desvio padrão

DXA: Absorciometria de raios-X de dupla energia (do inglês *Dual-energy X-ray absorptiometry*)

EDTA k3: Etilenodiaminotetraacetato k3

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*)

ER: Receptor de estrogênio

FC: Fold-change

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FC_{máx}: Frequência Cardíaca Máxima

FGFR: Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês, *Fibroblast Growth Factor Receptor*)

GSK3B: Glicogênio sintase quinase 3 beta

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

HIIT: Treinamento Intervalado de Alta Intensidade

IKK: IκB quinase

IL-10: Interleucina 10

IL-11: Interleucina 11

IL-6: Interleucina-6

IMC: Índice de massa corporal

ISCD: Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (do inglês *International Society for Clinical Densitometry*)

KEGG: Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

Ki67: Marcador de proliferação celular tumoral

KRAS: Oncogene que codifica uma proteína envolvida na regulação do crescimento e da sobrevivência celular.

LaCTAD: Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida

LAPE: Laboratório de Patologia Experimental

LPS: Lipopolissacarídeos

miRNAs: microRNAs

miRTarBase: Banco de dados que cataloga interações validadas experimentalmente entre microRNAs e seus genes-alvo.

MWCO: Peso molecular de corte (do inglês *Molecular weight cutoff*)

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NTA: Análise de rastreamento de nanopartículas (do inglês, *Nanoparticle Tracking Analysis*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAM: Potência Aeróbia Máxima

pb: Pares de bases

PBMCs: Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês *Phosphate-buffered saline*)

PCR: Ponto de Compensação Respiratória

PI3K: Fosfoinosítídeo 3-quinase

PIK3CD: Fosfoinosítídeo 3-quinase delta

PR: Receptor de progesterona

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog (Homólogo de Fosfatase e Tensin)

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RELA: Subunidade do fator de transcrição NF- κ B.

RISC: RNA-induced silencing complex (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)

RPM: Leituras por milhão (do inglês *Reads Per Million*)

rpm: Rotações por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEC: Cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês, *Size-exclusion chromatography*)

SP-IRS: Sensoriamento por Imagem Interferométrica de Partícula Única

SRC: Proto-oncogene que codifica uma tirosina quinase não receptora.

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription (Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição)

STAT-1: Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição 1 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*)

TA: Treinamento Aeróbio

TBS-T: Tris-Buffered Saline com Tween 20

TC: Treinamento Combinado

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TF: Treinamento de Força

TNF: Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor*)

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TRIzol: Nome comercial de um reagente para extração de RNA

TSmiRs: Tumor Suppressor miRs (miRNAs supressores de tumor)

Unicamp: Universidade Estadual de Campinas

UTR: Untranslated Region (Região Não Traduzida)

VCO₂: Produção de dióxido de carbono

VES: Vesículas Extracelulares

VO_{2máx}: Consumo máximo de oxigênio

VO_{2pico}: Consumo de oxigênio pico

WTBS: Weight Training for Breast Cancer Survivors (Treinamento de Peso para Sobreviventes de Câncer de Mama)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismo hipotético do treinamento físico no controle da progressão do câncer de mama por meio da comunicação molecular entre células de diferentes órgãos/tecidos e células cancerosas.....	24
FIGURA 2. Fluxo de pacientes triadas, excluídas, descontinuadas e incluídas no projeto.....	29
FIGURA 3. Visão geral do desenho experimental do modelo clínico.....	30
FIGURA 4. Concentração e perfil de tamanho de partículas em amostras purificadas de plasma de pacientes com câncer de mama.....	47
FIGURA 5. Caracterização de VEs em frações obtidas de pacientes com câncer de mama antes e após uma sessão de TC (pré e pós).....	48
FIGURA 6. Contagem de partículas positivas para tetraspaninas no plasma livre de plaquetas de pacientes com câncer de mama antes e após uma sessão de treinamento combinado em estado destreinado.....	50
FIGURA 7. Abundância relativa dos miRNAs identificados antes e após a sessão de TC.....	52
FIGURA 8. Expressão diferencial e os níveis de expressão de múltiplos miRNAs nos diferentes momentos (pré e pós-exercício).....	53
FIGURA 9. Rede de interação miRNA-alvo com os 21 módulos representados em diferentes cores.....	55
FIGURA 10. Análise de enriquecimento de termos para miRNAs diferencialmente regulados.....	57
FIGURA 11. Interação entre genes associados ao câncer de mama e à sinalização de citocinas no sistema imune.....	58
FIGURA 12. miRNAs <i>up-regulated</i> (em vermelho) e <i>down-regulated</i> (em azul) e suas interações com genes associados especificamente ao câncer de mama.....	60
FIGURA 13. miRNAs <i>up-regulated</i> (em vermelho) e <i>down-regulated</i> (em azul) e suas interações com genes associados especificamente a citocinas.....	62
FIGURA 14. miRNAs <i>up-regulated</i> (em vermelho) e <i>down-regulated</i> (em azul) e suas interações com genes associados especificamente a quimiocinas.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características das pacientes no momento inicial (*baseline*).....44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	28
2.1. Geral	28
2.2. Específico	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Participantes	29
3.2. Desenho experimental	30
3.3. Avaliações de caracterização	32
3.3.1. Histologia.....	32
3.3.1.1. Preparação do material para imunohistoquímica	32
3.3.1.2. Detecção e interpretação dos resultados da imunohistoquímica.....	33
3.3.2. Composição corporal - Absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) ..	33
3.3.3. Avaliação da força muscular – Teste de uma repetição máxima (1-RM)	34
3.3.4. Aptidão cardiorrespiratória – Teste de consumo máximo de oxigênio (VO₂máx).....	34
3.4. Protocolo de exercícios	36
3.4.1. Protocolo de treinamento combinado (TC).....	36
3.5. Coleta de material biológico	36
3.5.1. Coletas de sangue.....	36
3.6. Avaliações – Variáveis dependentes.....	37
3.6.1. Análise de c-miRNAs em VEs	37
3.6.1.1. Procedimento de centrifugação para preparação do plasma sanguíneo	37
3.6.1.2. Isolamento das VEs	38
3.6.1.3. Caracterização e quantificação das vesículas	38
3.6.1.3.1. Quantificação da concentração de proteínas.....	38

3.6.1.3.2. Análise de rastreamento de nanopartículas - <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	38
3.6.1.3.3. Análise de vesículas diretamente no plasma sanguíneo - Sensoriamento por imagem interferométrica de partícula única (SP-IRS) e imunofluorescência.....	39
3.6.1.3.4. Western Blotting.....	39
3.6.2. Expressão de miRNAs associados a VEs	40
3.6.2.1. Extração de RNA de VEs.....	40
3.6.2.2. Controle de Qualidade	41
3.6.2.3. Sequenciamento de miRNAs	42
3.6.3. Análise diferencial e <i>in silico</i>	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Caracterização das pacientes.....	44
4.2. Efeitos de uma sessão de TC nos níveis sistêmicos de VEs em pacientes com câncer de mama	46
4.3. Efeitos de uma sessão de TC na expressão de miRNAs associados a VEs	51
4.4. Enriquecimento de vias	55
4.5. Efeitos de uma sessão de TC na expressão de miRNAs associados à inflamação..	58
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO I.....	97
APÊNDICE I.....	98

1. INTRODUÇÃO

Mesmo que tenha origem multifatorial, o câncer é caracterizado como uma doença crônico-degenerativa que pode desencadear um processo inflamatório independente (DEL PRETE et al., 2023; OZGA; CHOW; LUSTER, 2021). A inflamação se apresenta como uma resposta protetora do organismo à ação de patógenos ou sinais endógenos, tais como células danificadas, exclusão de células necróticas, reparo e regeneração tecidual (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). Após detecção de anormalidades nas células, o processo inflamatório é desencadeado pela liberação de agentes pró inflamatórios, tais como, quimiocinas e citocinas, como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DINARELLO, 2007; NETEA et al., 2017). À medida que a inflamação se desenvolve e o agente estressor é combatido, o sistema imune desencadeia um mecanismo de autorregulação, através de quimiocinas e citocinas anti-inflamatórias, para retornar a homeostase do organismo (DINARELLO, 2007; NETEA et al., 2017; OUYANG et al., 2011). No entanto, o processo inflamatório pode se tornar crônico se a origem da inflamação persistir ou se mecanismos de controle responsáveis por impedir o processo falharem (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019). Nesse contexto, alterações celulares podem gerar um ambiente propício para o desenvolvimento, sobrevivência, e proliferação do tumor cancerígeno (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019). Com isso, este processo culmina na formação de neoplasias, ou seja, massas teciduais caracterizadas por um crescimento desordenado e invasivo (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019). A capacidade invasiva das células tumorais, aliada à sua propensão para invadir órgãos distantes, confere ao câncer uma notável complexidade e gravidade clínica (ROXBURGH; MCMILLAN, 2014).

Dentre os diversos tipos, o câncer de mama é um dos que mais incidentes e prevalentes (GIAQUINTO et al., 2022). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2022, 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, resultando em 666.103 óbitos em escala global. Além disso, foi identificado que até o final de 2022, aproximadamente 7,8 milhões de mulheres ainda estavam vivas após terem sido diagnosticadas com esse tipo de câncer nos últimos 5 anos (SUNG et al., 2021). Considerando as causas primárias para o desenvolvimento desse tipo de câncer, cerca de 85% dos casos ocorrem em mulheres sem histórico familiar (KAMIŃSKA et al., 2015), sendo que a maioria das vezes são associados principalmente a fatores de estilo de vida, como inatividade física, obesidade e, inflamação crônica (FRIEDENREICH; RYDER-BURBIDGE; MCNEIL, 2021). Felizmente, avanços em técnicas de análises histológicas permitiram identificar subtipos de câncer de mama, influenciando positivamente o

desenvolvimento e a resposta ao tratamento, contudo, apesar desse avanço, o câncer e o tratamento podem induzir efeitos colaterais, agravando o prognóstico da paciente.

Após o diagnóstico, tratamentos como a quimioterapia têm se mostrado eficazes para aumentar a taxa de sobrevivência em mulheres afetadas pela doença (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG) et al., 2011). No entanto, embora ofereçam benefícios importantes, esses tratamentos estão associados a uma série de efeitos adversos que podem impactar negativamente a saúde das pacientes (GUIGNI et al., 2018). Entre os principais efeitos adversos estão o aumento da inflamação, a redução da força e massa muscular esquelética e cardíaca, e a diminuição da aptidão aeróbia (i.e., consumo máximo de oxigênio - $VO_{2máx}$). Esses fatores, apesar de não estarem diretamente relacionados a origem do câncer, podem agravar o quadro geral de saúde, levando a consequências como diminuição da funcionalidade física, aumento da fadiga relacionada ao câncer, complicações em procedimentos cirúrgicos, maior toxicidade das drogas utilizadas no tratamento e até mesmo redução da efetividade das terapias oncológicas (BOEKEL et al., 2018). Assim, embora a inflamação não seja apontada como causa do câncer, ela pode ser exacerbada pelos tratamentos e contribuir para piora da saúde geral. Coletivamente, esses efeitos adversos reduzem a qualidade de vida das pacientes e podem aumentar a mortalidade durante o tratamento (KAZEMI-BAJESTANI; MAZURAK; BARACOS, 2016). Portanto, intervenções direcionadas para atenuar ou reverter esses efeitos adversos precisam ser desenvolvidas e implementadas antes do início do tratamento – durante o período chamado "janela de oportunidade" – com o objetivo de melhorar a saúde global das mulheres com câncer de mama nesse estágio crítico.

O treinamento físico é um estímulo fisiológico e não farmacológico capaz de induzir adaptações benéficas, melhorando a saúde e reduzindo riscos de morbimortalidade (“ACSM’s Guidelines for Exercise Testing and Prescription”, [s.d.]). Ademais, adversidades relacionadas ao câncer e seus tratamentos, como náusea, fraqueza muscular, perda de massa muscular, e diminuição da aptidão aeróbia, fatores determinantes para o bom prognóstico do paciente, são significativamente amenizadas pelo treinamento físico (CAMPBELL et al., 2019). Particularmente, protocolos sistematizados de exercícios, com controle de variáveis como volume, intensidade e frequência, são fundamentais no tratamento, reduzindo mortalidade. Nesse sentido, estudos com meta-análises evidenciam que intervenções de exercício diminuem a inflamação, aumentam a força e a massa muscular, a aptidão aeróbia, e reduzem o índice de massa corporal e a

massa gorda em sobreviventes de câncer de mama (SCHMID; LEITZMANN, 2014). Entretanto, a variedade de intervenções destaca a necessidade de compreender as adaptações específicas de cada protocolo para otimizar os benefícios nesses pacientes.

Uma modalidade muito investigada é o treinamento de força (TF) ou musculação, o qual demonstra induzir adaptações neurais e morfológicas que aumentam a capacidade de trabalho do músculo esquelético. Estudos, especialmente focados em mulheres com câncer de mama, destacam a importância do TF na manutenção e aumento da massa magra e da força muscular para a sobrevivência da paciente, demonstrando que menos massa muscular está atrelada ao aumento de mortalidade (ADAMS et al., 2016; COURNEYA et al., 2007; SCHMITZ et al., 2005). A revisão sistemática de Montaña-Rojas et al. (2020) resume que os programas de TF, geralmente supervisionados e variando em duração de 12 a 96 semanas, promovem segurança e significativas melhorias na força muscular, fadiga, dor e qualidade de vida em sobreviventes de câncer de mama (MONTAÑO-ROJAS et al., 2020). Outros estudos específicos, como o "Weight Training for Breast Cancer Survivors (WTBS)" de Schmitz et al. (2005) e o trabalho de Madzima et al. (2017), destacam aumentos significativos na massa magra e força muscular em sobreviventes de câncer de mama após programas de TF (MADZIMA et al., 2017; SCHMITZ et al., 2005). Já Courneya et al. (2007) separaram pacientes com câncer de mama em um grupo que realizou TF e outro que realizou treinamento aeróbio (TA) e demonstraram que o TF foi mais eficiente que o TA para aumentar força muscular, bem como demonstrou ser efetivo para aumentar a massa muscular (COURNEYA et al., 2007). Entretanto, apesar desses efeitos positivos, observa-se que o TF tem pouco impacto na aptidão aeróbia, sugerindo a necessidade de protocolos que visem adaptações cardiorrespiratórias em conjunto com o TF para mulheres com câncer de mama.

O TA tem se mostrado eficaz na melhoria da potência e aptidão aeróbia, resultando em alterações tanto centrais quanto periféricas no sistema cardiorrespiratório (BARNETT et al., 2004) e estudos robustos destacam que essa modalidade promove aumentos significativos em variáveis de aptidão aeróbia, bem como o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$), determinante para a sobrevivência da paciente (BELL et al., 2000; GIBALA; HAWLEY, 2017). Mulheres com câncer de mama, frequentemente apresentando comprometimento na aptidão aeróbia devido à quimioterapia adjuvante, tornam-se uma população de interesse. De fato, resultados trazidos por Kim et al. (2006) sugerem que programas de TA supervisionados podem aumentar o $VO_{2máx}$ nesse contexto (KIM et al., 2006). Resultados similares foram observados por Jones et al. (2013), que combinaram TA com

quimioterapia neoadjuvante, evidenciando melhorias significativas no $VO_{2máx}$ em comparação com o grupo que recebeu apenas quimioterapia (JONES et al., 2013). Estudos recentes, como o de Bjorke et al. (2022), investigaram intervenções de TA intervalado em alta intensidade (HIIT), sugerindo benefícios na manutenção da aptidão aeróbia durante a quimioterapia (BJØRKE et al., 2022). Além disso, revisões sistemáticas corroboram a eficácia global do TA, especialmente em protocolos de intensidade vigorosa como o HIIT, para aumentar o $VO_{2máx}$ em mulheres com câncer de mama durante a quimioterapia (MAGINADOR et al., 2020). Contudo, é importante notar que, ao contrário do TF, o TA geralmente tem pouco impacto na força e hipertrofia muscular (FYFE et al., 2018) e, dessa forma, protocolos de treinamento que abordam ambas as adaptações neuromusculares e cardiorrespiratórias aparecem como estratégias eficientes para melhorar a saúde dessa população.

A estratégia de treinamento combinado (TC), que envolve a realização simultânea de exercícios de TF e TA em um mesmo período, tem sido destacada como a abordagem padrão-ouro não farmacológica para melhorar parâmetros inflamatórios, a massa muscular, e a aptidão aeróbia de mulheres com câncer de mama (CAMPBELL et al., 2019). Estudos, como o de Herrero et al. (2006), revelam que um programa de TC de oito semanas em sobreviventes de câncer de mama resultou em aumentos significativos na massa muscular, força muscular dos membros inferiores e aptidão aeróbia (HERRERO et al., 2006). O ensaio clínico OptiTrain, conduzido por Mijwel et al. (2018), comparou TC, TA e um grupo controle, evidenciando que tanto o TC quanto o TA preservaram o VO_{2pico} durante a quimioterapia, enquanto o grupo controle apresentou declínio significativo (MIJWEL et al., 2018). Estudos, como o realizado por De Paulo et al. (2019), demonstraram que o TC promove aumentos significativos na aptidão aeróbia em mulheres sobreviventes ao câncer de mama, bem como na força muscular dos membros inferiores e na massa muscular (DE PAULO et al., 2019). Esses ganhos podem ser fundamentais, pois pacientes com maior massa muscular tendem a tolerar melhor os tratamentos agressivos, como quimioterapia e radioterapia, além de apresentarem menos complicações durante o processo (ABE et al., 2022; AMITANI et al., 2022). Já foi observado também que o TC é o melhor protocolo de treinamento para induzir diminuição sistêmica de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (KHOSRAVI et al., 2019).

Dessa forma, ao iniciar o TC antes do tratamento, as pacientes têm a oportunidade de fortalecer sua musculatura, o que pode reduzir a inflamação, diminuir a taxa de perda muscular

associada a certas terapias contra o câncer e, ao melhorar a massa muscular, o TC pode ajudar a preservar a função física e a qualidade de vida das pacientes durante o tratamento, tornando-as mais aptas a enfrentar os desafios físicos que surgem durante o processo de cura. Além disso, é plausível sugerir que, se realizado antes do tratamento, o TC vai aumentar a aptidão aeróbia, prevenindo quedas drásticas dessa variável durante o tratamento. Portanto, o TC emerge como uma estratégia eficaz não apenas para mitigar os efeitos adversos do tratamento e do câncer, mas também para preparar o corpo da paciente, tornando-o mais resistente e capaz de enfrentar o processo terapêutico com maior eficiência e menor impacto negativo (ADAMS et al., 2016; ADAMSEN et al., 2006). Além disso, nos últimos anos, tem sido apontado que o treinamento físico pode induzir adaptações além das variáveis clínicas.

O treinamento físico em mulheres com câncer de mama não apenas induz adaptações fisiológicas extrínsecas ao tumor, mas também demonstra uma conexão direta com o controle intrínseco do tumor, potencialmente melhorando os resultados clínicos das pacientes durante o tratamento (HOJMAN et al., 2011). Uma análise abrangente compreendendo uma revisão sistemática e metanálise de 28 estudos pré-clínicos, envolvendo 2085 animais, conduzida por Figueira et al. (2018), revelou que a prática de exercícios físicos promoveu notáveis efeitos redutores no câncer. Os resultados indicaram uma redução significativa no número total de tumores (-20,2%), no número de tumores por animal (-63,2%), no peso (-36,6%), e no volume do tumor (-44,3%) (FIGUEIRA et al., 2018). Além disso, já foi demonstrado que a proliferação tumoral, frequentemente avaliada por meio de marcadores imunohistoquímicos e moleculares (e.g. proteína Ki67), apresentou uma diminuição marcante de 79,4% (STUART-HARRIS et al., 2008). Ademais, em estudo específico conduzido em um modelo murino de tumor de mama, revelou que a terapia hormonal neoadjuvante combinada com um protocolo de cinco semanas de treinamento aeróbico intervalado não apenas reduziu o volume tumoral, mas também diminuiu a expressão de Ki67, um marcador nuclear crucial para a proliferação celular, cujo aumento está associado a uma pior sobrevida em pacientes com câncer de mama (CHEANG et al., 2009). Assim, essas descobertas impulsionaram pesquisas adicionais para elucidar os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce influência direta sobre o controle do desenvolvimento do câncer de mama.

O exercício físico é um estímulo complexo que desencadeia uma série de respostas adaptativas no corpo humano. Essas respostas incluem a liberação de hormônios como cortisol e epinefrina, a mobilização de substratos energéticos como glicose e ácidos graxos livres, e a ativação

de sistemas de regulação cardiovascular e imunológica. Estudos anteriores, como o de Hawley et al. (2014), destacam a importância dessas respostas agudas do organismo ao exercício na sua adaptação ao esforço físico. Essas adaptações influenciam desde a produção de energia até a modulação do estado inflamatório e a regulação do metabolismo (HAWLEY et al., 2014). Inicialmente, a literatura científica concentrou-se nas miocinas, moléculas expressas pelo músculo esquelético em resposta ao exercício. No entanto, nas últimas décadas, pesquisas têm evidenciado que outros tecidos, como o adiposo e o fígado, também produzem e liberam fatores em resposta ao exercício físico (GÖRGENS et al., 2015). Para descrever esse grupo diverso de moléculas liberadas na circulação em resposta ao exercício, Safdar et al. (2016) cunharam o termo "exercinas" (SAFDAR; SALEEM; TARNOPOLSKY, 2016). As exercinas incluem peptídeos, metabólitos, DNA e diferentes espécies de RNA. Consideradas a soma dos fatores humorais liberados por diferentes tecidos, as exercinas desempenham um papel crucial na comunicação intercelular e nos efeitos sistêmicos do treinamento físico, inclusive em populações com câncer de mama (DETHLEFSEN; PEDERSEN; HOJMAN, 2017).

De fato, estudos como o de Hojman et al. (2011) sugerem que os efeitos benéficos do exercício podem ser mediados por exercinas secretadas na corrente sanguínea durante a sua realização (HOJMAN et al., 2011). Os efeitos sistêmicos do exercício podem ocorrer através do transporte das exercinas pelas vesículas extracelulares (VEs), sugeridas como veículo essencial para a comunicação intercelular (SAFDAR; TARNOPOLSKY, 2018). Essas VEs podem desempenhar um papel fundamental na disseminação das exercinas e na amplificação dos efeitos sistêmicos do exercício, oferecendo novas perspectivas para entender os mecanismos pelos quais o exercício influencia a fisiologia e a patologia do organismo. Assim, os resultados sugerem que as respostas sistêmicas agudas induzidas por cada sessão de exercício ao longo do treinamento podem ser cruciais para os efeitos benéficos intrínsecos no tumor de mama.

Neste sentido, Frühbeis et al. (2015) examinaram o efeito agudo do TF na liberação de VEs em homens jovens, revelando aumentos transitórios nas VEs após o exercício (FRÜHBEIS et al., 2015). A pesquisa mais recente de Whitham et al. (2018) investigou o proteoma de VEs produzidas pelo exercício, identificando uma variedade de proteínas (WHITHAM et al., 2018), que sugerem que, em resposta ao exercício agudo, o músculo esquelético tem a capacidade de desencadear mecanismos de sinalização entre tecidos. Apesar dos benefícios sistêmicos do treinamento físico, os complexos fatores humorais que mediam esses efeitos ainda não foram totalmente elucidados.

A compreensão desses fatores é vital para desenvolver estratégias terapêuticas em diversas condições de saúde. Pesquisas em andamento buscam identificar os constituintes específicos das exercinas e compreender seu papel funcional na mediação dos benefícios do treinamento físico, bem como os mecanismos de transporte dessas moléculas entre órgãos (DETHLEFSEN; PEDERSEN; HOJMAN, 2017). Visto que o impacto direto do treinamento físico no controle do desenvolvimento tumoral é amplamente atribuído aos picos transitórios e repetidos na liberação de exercinas após cada sessão aguda de exercícios físicos (DETHLEFSEN et al., 2016), é essencial realizar estudos que analisem o conteúdo das VEs imediatamente após uma sessão de exercício em mulheres com câncer de mama. Com esse tipo de estratégia, seria possível verificar, por exemplo, se o conteúdo dessas VEs pode orquestrar uma resposta inflamatória.

Dentro das exercinas, os microRNAs (miRNAs), classificados como moléculas de RNA que apresentam de 20 a 30 nucleotídeos e com associação a proteínas do grupo argonauta, desempenham um papel crucial na regulação dos transcritos celulares (DUFRESNE et al., 2018). A pesquisa sobre miRNAs revelou uma diversidade na biogênese dessas moléculas, abrangendo tanto vias canônicas quanto não canônicas (TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019). No contexto da biogênese dos miRNAs, as vias canônicas referem-se aos processos tradicionais de formação e maturação dos miRNAs, envolvendo etapas como a transcrição do gene precursor de miRNA, o processamento pelo complexo Dicer e a incorporação do miRNA maduro no complexo RISC, liderado pela proteína Argonauta-2 (AGO2) (HA; KIM, 2014). Por outro lado, as vias não canônicas descrevem processos alternativos menos convencionais de biogênese de miRNAs, que podem ocorrer de maneira independente de algumas das proteínas normalmente envolvidas na via canônica. Após serem carregados no complexo RISC, os miRNAs interagem com seus mRNAs alvo, promovendo principalmente a degradação ou a repressão da tradução por meio do pareamento com regiões específicas, principalmente na região 3' UTR dos mRNAs. No entanto, sítios de ligação foram identificados em outras regiões dos mRNAs, ampliando o espectro de funções dos miRNAs, incluindo a capacidade de induzir transcrição e tradução em algumas circunstâncias (MORI et al., 2019). É importante destacar que mais de 60% dos genes codificadores de proteínas possuem regiões de ligação para miRNAs (FRIEDMAN et al., 2009). A função dos miRNAs na comunicação intercelular é respaldada pela presença de miRNAs circulantes (c-miRNAs) na corrente sanguínea, transportados por VEs ou em associação com proteínas. Esses c-miRNAs têm

potencial como biomarcadores e desempenham um papel crucial no controle celular, sendo frequentemente associados a várias doenças, incluindo o câncer de mama (HA; KIM, 2014).

Em diversos estudos, como o de Adhami et al. (2018), foi observado que há uma expressão diferenciada de miRNAs em tecidos cancerosos em comparação com tecidos normais (ADHAMI et al., 2018). Essa expressão anormal está associada a processos celulares fundamentais, como apoptose, proliferação, diferenciação e renovação de células-tronco, que, quando desreguladas, contribuem para as características conhecidas como *hallmarks of cancer*. É importante ressaltar que existem miRNAs que podem atuar como reguladores positivos, promovendo a proliferação e progressão do câncer (i.e., oncomiRs), e outros que atuam como reguladores negativos (i.e., *tumor suppressor* miRs – TSmiRs), inibindo esses processos. Portanto, a expressão alterada desses miRNAs pode tanto favorecer o desenvolvimento do câncer, quanto potencialmente inibir seu avanço. Estudos específicos, como os conduzidos por Khalighfard et al. (2018), têm destacado a presença de certos c-miRNAs no soro e plasma de pacientes com câncer de mama (KHALIGHFARD et al., 2018). Além disso, intervenções que visam modular a expressão desses miRNAs, como o treinamento físico, estão emergindo como estratégias promissoras no controle tumoral e na melhoria do prognóstico para pacientes com câncer de mama. Estudos em modelos animais e em humanos com câncer de mama evidenciam a influência positiva do treinamento físico nos níveis de c-miRNAs (ALIZADEH et al., 2019). Em experimentos com camundongos, a combinação de TA e tratamento hormonal mostrou efeitos significativos na expressão de miR-21, miR-206 e let-7, associados a uma redução no crescimento tumoral. Esses c-miRNAs têm sido associados a processos de controle do desenvolvimento, progressão e metástase tumoral, bem como relacionados à regulação de processos celulares, incluindo a carcinogênese e a resposta inflamatória (BAHIRAEE et al., 2019).

Em humanos, intervenções para perda de peso e TF apresentaram modulações específicas nos níveis de c-miRNAs (e.g., c-miR-191-5p, -24-3p, let-7b-5p, -106b-5p, -27a-3p e -92a-3p), sugerindo potenciais efeitos na biologia tumoral (ADAMS et al., 2018). Além disso, diversas pesquisas indicam que o exercício físico influencia a expressão de miRNAs, desempenhando um papel crucial nas adaptações morfológicas, fisiológicas e imunológicas promovidas pelo TA, TF e TC (DE PAULO et al., 2019; DETHLEFSEN et al., 2016). Além de impactar o músculo esquelético, diferentes regimes de treinamento podem liberar c-miRNAs, especialmente transportados por VEs (MCKELVEY et al., 2015). Por exemplo, o miR-133 é normalmente

expresso no músculo esquelético (TELLES et al., 2021) e aumenta significativamente na corrente sanguínea após uma sessão de exercícios (BAGGISH et al., 2014). Pulliero et al. (2020) demonstraram que uma sessão de TA modula a expressão de 14 c-miRNAs relacionados a vias importantes para o controle do desenvolvimento e progressão do câncer (PULLIERO et al., 2020). Isso inclui a supressão de oncogenes e metástases, a regulação da proliferação celular, apoptose e invasão do câncer, em mulheres saudáveis na pós-menopausa. Especificamente, a expressão de c-miR-206, um TSmiR, foi aumentada, enquanto os níveis de c-miR-30c, um oncomiR, foram diminuídos. Portanto, é plausível sugerir que os miRNAs podem ser transportados do músculo e de outros tecidos/órgãos para a corrente sanguínea em resposta ao exercício físico, regulando a expressão gênica em vias associadas ao crescimento e supressão do câncer de mama, controlando assim o desenvolvimento tumoral, bem como destaca a **Figura 1** (DUFRESNE et al., 2018).

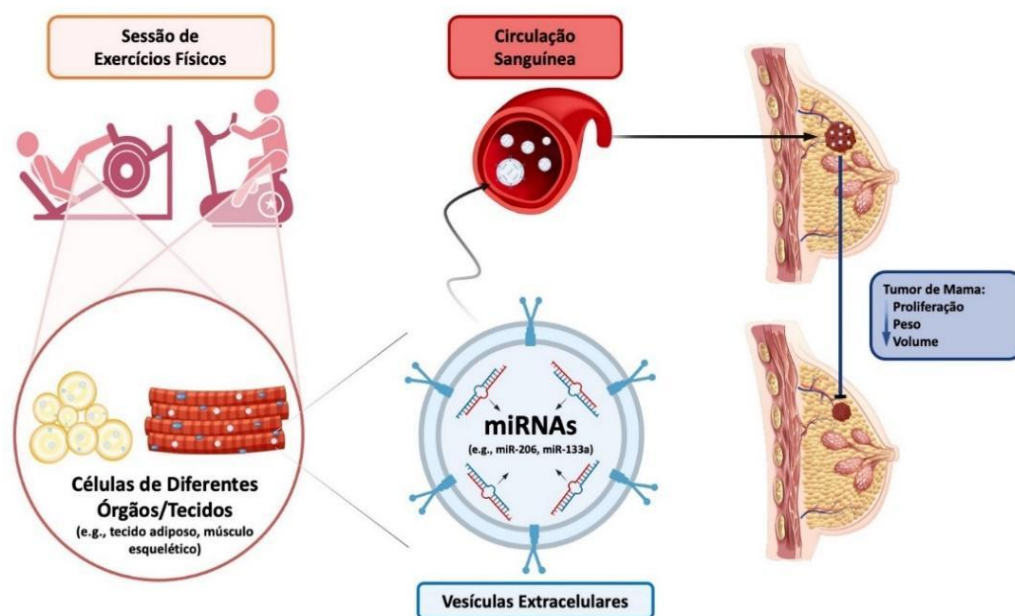


FIGURA 1. Mecanismo hipotético do treinamento físico no controle da progressão do câncer de mama por meio da comunicação molecular entre células de diferentes órgãos/tecidos e células cancerosas. Durante as sessões de treinamento, miRNAs são produzidos em células de vários órgãos/tecidos e podem ser liberados na corrente sanguínea através de VEs. Esses c-miRNAs circulam até o tumor de mama, onde exercem atividade anticâncer, influenciando o desenvolvimento tumoral. Imagens retiradas de Freepik.com

Caracteristicamente, uma condição que pode propiciar o desenvolvimento e progressão do câncer de mama é a inflamação crônica (ARGILÉS et al., 2015; BARACOS et al., 2018; BARACOS; MAZURAK; BHULLAR, 2019), inflamação esta potencialmente mediada por c-miRNAs (e.g., miRNA-21, -155, -146, -200, -181). Uma importante revisão de 2019 destaca quase 60 miRNAs associados à inflamação no câncer de mama por diferentes vias (e.g., citocinas, IL-6/STAT, PTEN/PI3K/Akt, IKK/NF- κ B) (BAHIRAEE et al., 2019). Os autores também ressaltam que citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), têm sido fortemente associadas ao aumento do risco de câncer de mama, estimulando processos pró-tumorais, incluindo proliferação celular descontrolada, angiogênese e resistência à apoptose. Ademais, a presença de inflamação sistêmica pode modular a resposta imunológica, influenciando a capacidade do organismo em reconhecer e combater as células cancerosas (PEDERSEN, 2011). A interação entre inflamação, citocinas e miRNAs parece desempenhar um papel fundamental em diversos contextos biológicos, incluindo o câncer de mama. Citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, não apenas contribuem para a inflamação sistêmica associada ao câncer, mas também podem ser moduladas por diversos miRNAs (ASHRAFIZADEH et al., 2022). Esses miRNAs podem modular citocinas inflamatórias, formando uma rede complexa de interações.

Sendo assim, há indicações de que o câncer possa desencadear uma resposta pró-inflamatória mediada por oncomiRs, potencialmente impulsionando a tumorigênese. Por outro lado, há evidências que sugerem que a prática regular de exercícios físicos pode provocar uma série de efeitos benéficos, incluindo a redução da inflamação e a expressão de c-miRNA supressores de tumores. Não obstante, é crucial aprofundar a investigação para determinar se há uma conexão entre os c-miRNA estimulados pelo exercício físico, a inflamação e, conseqüentemente, a resposta tumoral. Essa abordagem integrada pode fornecer *insights* valiosos para otimizar estratégias terapêuticas que visam modular essas vias complexas, promovendo uma compreensão mais completa e eficaz dos benefícios do treinamento físico em pacientes com câncer de mama.

Considerando todo o conteúdo apresentado, a presente dissertação teve como objetivo geral investigar os efeitos de uma única sessão de TC na expressão de c-miRNAs presentes em VEs de mulheres com câncer de mama antes do início do tratamento oncológico, focando nos c-miRNAs associados à inflamação para elucidarmos eventuais mecanismos moleculares associados à resposta dessa sessão de TC. Para alcançar esse objetivo, procuramos responder às seguintes perguntas:

1. Uma sessão de TC altera os níveis sistêmicos de VEs em pacientes com câncer de mama?
2. Quais são os efeitos de uma sessão de TC na expressão de miRNAs incorporados a VEs em pacientes com câncer de mama?
3. Uma sessão de TC pode alterar a expressão de miRNAs associados a vias inflamatórias em pacientes com câncer de mama?

Nossas hipóteses são que:

1. Uma sessão de TC aumenta os níveis sistêmicos de VEs em pacientes com câncer de mama.
2. Uma sessão de TC altera a expressão de miRNAs associados às VEs, promovendo um aumento na expressão de miRNAs relacionados à supressão tumoral e uma redução na expressão de oncomiRs circulantes.
3. Uma sessão de TC reduz a expressão de oncomiRs e aumenta a expressão de TSmiRs relacionados a vias inflamatórias em pacientes com câncer de mama, favorecendo um perfil molecular potencialmente benéfico para o controle do desenvolvimento tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar os efeitos de uma sessão única de treinamento combinado (TC) na expressão de c-miRNAs relacionados à inflamação, incorporados em vesículas extracelulares (VEs), em mulheres com câncer de mama antes do início do tratamento.

2.2. Específico

Resposta Aguda à Sessão Única de TC: Avaliar se a expressão dos c-miRNAs relacionados à inflamação (e.g., miRNA-21, -155, -146, -200, -181), incorporados em VEs, apresenta mudanças imediatas em termos de magnitude e especificidade após uma sessão única de TC em comparação aos níveis pré-exercício.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no período entre o diagnóstico e o início do tratamento, e foi conduzido no Centro de Estudos em Exercício e Oncologia (CEEEO).

3.1. Participantes

Mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama e atendidas nos ambulatórios de mastologia e oncologia clínica do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism), uma das unidades hospitalares da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), foram consideradas potenciais participantes desta pesquisa. Todas as participantes seguiram o tratamento oncológico conforme o protocolo assistencial estabelecido pelo serviço, sendo importante ressaltar que este projeto não interferiu na conduta clínica regular das pacientes.

As pacientes elegíveis foram mulheres com idade superior a 18 anos, classificadas nos estágios de I a III da doença, diagnosticadas e encaminhadas para tratamento neoadjuvante, adjuvante ou cirurgia. Critérios de exclusão incluíram: 1) envolvimento em um programa sistematizado de treinamento físico nos seis meses anteriores ao estudo; 2) autodeclaração de incapacidade para realizar exercícios físicos; 3) contraindicação médica para exercícios; 4) condições clínicas que impossibilitassem o tratamento; e 5) neuropatia. Critérios de descontinuação foram estabelecidos como: 1) ausência em consultas, avaliações e sessões de treinamento; e 2) progressão da doença com metástases ósseas e/ou cerebrais.

Após a triagem inicial, as pacientes foram completamente informadas sobre os procedimentos do estudo e convidadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), formalizando sua participação. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sob o número: 6.436.383.

A **Figura 2** apresenta o fluxo de pacientes triadas e incluídas no projeto. Ao todo, 590 mulheres atendidas no CAISM foram avaliadas para elegibilidade. Destas, 575 foram excluídas por não atenderem aos critérios de inclusão, com as razões principais sendo: diagnóstico de câncer de mama em estágio 0 (n = 121), recidiva de câncer (n = 58), limitações físicas (n = 57), presença de outros tipos de câncer (n = 29), metástases (n = 23), prática regular de atividade física (n = 17),

entre outros motivos (n = 152). Além disso, 118 pacientes elegíveis optaram por não participar do estudo (e.g., devido a indisponibilidade de tempo). Três pacientes precisaram ser descontinuadas por não conseguirem comparecer à sessão de treino.

Assim, 12 pacientes participaram do estudo para investigar se uma sessão de treinamento físico altera os níveis sistêmicos de VEs e para avaliar o efeito agudo do treinamento físico sobre a expressão de miRNAs associados às VEs. Para essa análise, o sangue coletado de todas as 12 pacientes, tanto antes quanto após uma sessão de TC, foi combinado em um *pool* para extração de VEs.

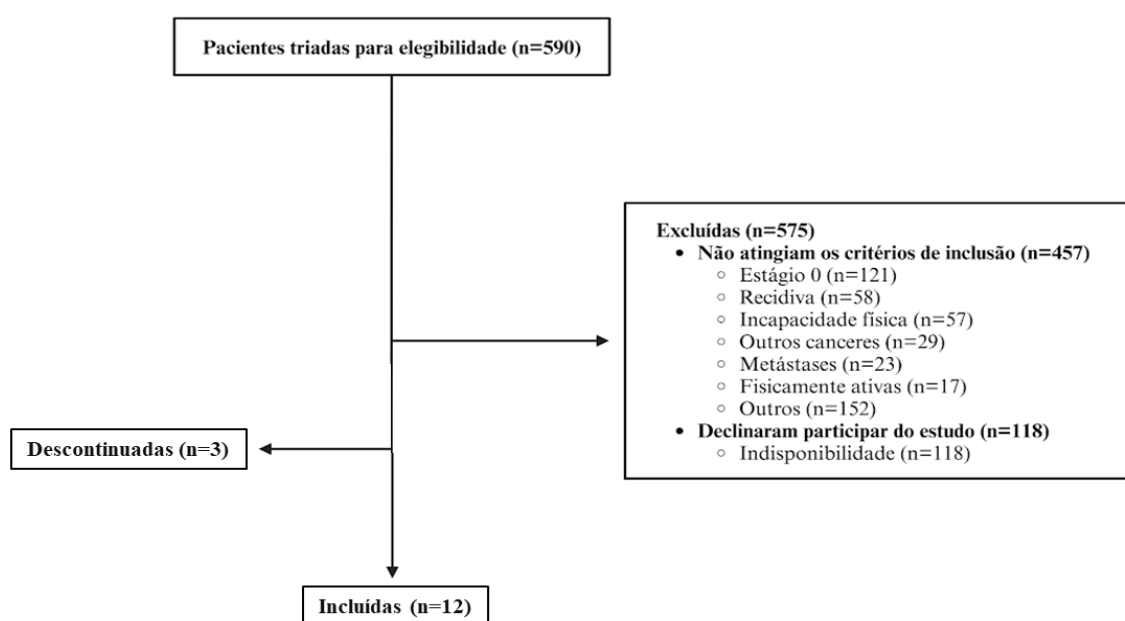


FIGURA 2. Fluxo de pacientes triadas, excluídas, descontinuadas e incluídas no projeto.

3.2. Desenho experimental

Após o diagnóstico confirmado por biópsia de tecido tumoral, as mulheres diagnosticadas com câncer de mama e indicadas para tratamentos específicos, como cirurgia inicial ou quimioterapia (neoadjuvante ou adjuvante), foram convidadas a participar do estudo. As participantes que aceitaram tiveram uma amostra do tecido mamário coletada na biópsia destinada à análise de Ki67 e receptores hormonais.

Na primeira visita das participantes ao laboratório, elas realizaram a avaliação da composição corporal por absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA), seguida por familiarizações com as seguintes avaliações: 1) força muscular, medida pelo teste de uma repetição máxima (1-RM); e 2) capacidade cardiorrespiratória, avaliada pelo teste direto de $VO_{2\text{máx}}$. Em outra sessão, foi realizada de fato a avaliação da capacidade cardiorrespiratória, novamente medida pelo teste direto de $VO_{2\text{máx}}$, agora associado ao eletrocardiograma de esforço. Após 48 horas, elas retornaram ao laboratório para a sessão de exercícios, em que todas as participantes realizaram tanto os exercícios de força, como também o exercício aeróbio, em um cicloergômetro. Nessa sessão, foi realizado o teste de força muscular dinâmica por meio do teste de uma repetição máxima (1-RM) no *leg press* 180°. O teste de 1-RM foi considerado o primeiro exercício da primeira sessão de treinamento combinado. As amostras de sangue destinadas à análise de c-miRNAs foram coletadas em dois momentos distintos: 1) antes da sessão aguda de TC e 2) imediatamente após essa sessão. A **Figura 3** apresenta uma visão geral do delineamento experimental, estabelecendo a relação entre os objetivos específicos e as variáveis dependentes do projeto.

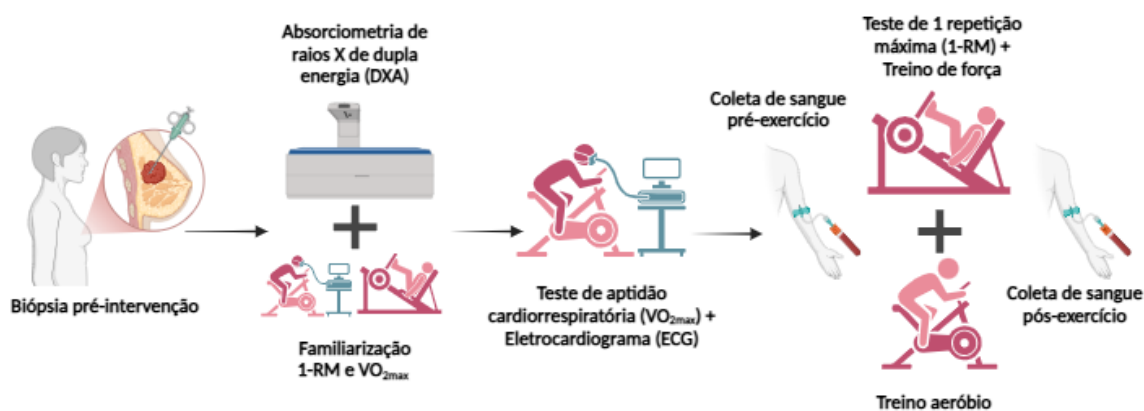


FIGURA 3. Visão geral do desenho experimental do modelo clínico. Após a biópsia inicial da mama, as pacientes com câncer de mama realizaram a avaliação da composição corporal por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) e participaram das sessões de familiarização para os testes de força muscular e aptidão cardiorrespiratória. Em seguida, as pacientes passaram pela avaliação de aptidão cardiorrespiratória, acompanhada de um eletrocardiograma. Após essas etapas, foi realizada a sessão de exercício (TC), iniciando com o teste de uma repetição máxima (1-RM), considerado o primeiro exercício da sessão. Amostras de sangue foram coletadas em dois momentos: antes (pré) e imediatamente após a sessão de TC.

3.3. Avaliações de caracterização

3.3.1. Histologia

O material biológico destinado à histologia foi obtido a partir de biópsias oncológicas ou peças cirúrgicas resultantes de procedimentos como mastectomias ou quadrantectomias, seguindo os protocolos padrão previamente estabelecidos pelo Caism-Unicamp de maneira rotineira. Inicialmente, mulheres com nódulos ou imagens mamárias sugestivas de malignidade, submetidas a biópsias de fragmentos sob orientação ultrassonográfica e realizadas pela equipe médica do Caism, foram convidadas a participar da coleta de material para diagnóstico e parafina, além do biobanco, mediante leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A autorização para o desenvolvimento do projeto com a utilização do biobanco está documentada no ANEXO I. Para armazenamento e processamento do material biológico, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Experimental (LAPE) do Caism/Unicamp, sob a supervisão do patologista responsável.

3.3.1.1. Preparação do material para imunoistoquímica

As lâminas foram hidratadas em soluções de álcool etílico nas concentrações decrescentes (100%, 80% e 50%) e lavadas com água destilada corrente. A peroxidase endógena foi bloqueada por três banhos, cada um com duração de 3 minutos, em água oxigenada a 10 volumes, seguidos de lavagem com água corrente e destilada. Para recuperação antigênica, utilizou-se a panela a vapor Pascal Dako, com o objetivo de "desmascarar" os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 (10 mM) a 95°C por 30 minutos, resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico (Ki67: clone MIB-1, Dako) nas diluições recomendadas pelo fabricante, a 4°C, overnight. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4 a 7,6), agitando, e secadas. Para detecção, as lâminas foram incubadas com o sistema ADVANCE™ HRP Detection System (Dako) a 37°C por uma hora, seguidas de três lavagens em PBS. A revelação foi realizada com o substrato cromogênico DAB (3'-diaminobenzidina, SIGMA, código D5637), preparado na proporção de 0,06

g para 100 mL de PBS, 500 µL de água oxigenada 3% e 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), a 37°C por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água corrente, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 30 a 60 segundos, desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas em três banhos de xilol, montadas em lamínula e resina (Entellan). Controles internos e externos positivos e negativos foram utilizados para validar as reações.

3.3.1.2. Detecção e interpretação dos resultados da imunoistoquímica

Os cortes parafinizados (4 µm de espessura) foram analisados utilizando o protocolo para sondas Kreatech®. Inicialmente, os cortes foram desparafinizados em xilol, desidratados em uma série de álcoois e deixados para secar à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com pepsina a 0,008% e lavados com tampão PBS. Após isso, os cortes foram incubados em formaldeído e novamente lavados em PBS. Seguiu-se uma incubação com proteinase K a 0,25 mg/mL, seguida de duas lavagens em SSC. Posteriormente, os cortes foram desidratados em uma série de álcoois e deixados a secar à temperatura ambiente. Os cortes foram então desnaturados em formamida a 70% e desidratados novamente em uma série de álcoois. Por fim, foi aplicado o corante DAPI (0,3 µg/mL, Vectashield) nas áreas selecionadas para contra coragem dos núcleos. Para a análise de Ki67, foi contada a porcentagem de núcleos corados com intensidade moderada e forte, sempre realizada por um patologista experiente do LAPE-CAISM.

3.3.2. Composição corporal - Absorciometria de raios X de dupla energia (DXA)

A composição corporal foi avaliada por meio de absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA), utilizando o equipamento GE Lunar DPX-NT (GE Healthcare, Madison, WI, USA). A avaliação foi realizada com uma varredura total do corpo da paciente, que foi exposta a dois diferentes níveis de energia (70 e 140 kilovolts), conforme os protocolos estabelecidos por Genton et al. (2002), e seguindo as recomendações da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (International Society for Clinical Densitometry – ISCD) (GENTON et al., 2002; LEWIECKI et al., 2008).

Antes da realização do exame, foi aplicado um questionário para garantir que as pacientes não tivessem realizado exames contrastados (com bário ou iodo) ou com radioisótopos nas últimas duas semanas, e que não estivessem grávidas. As participantes foram orientadas a se apresentarem ao exame em condições ideais: em jejum, ou após uma refeição leve, sem ter realizado exercícios físicos prévios e com a bexiga vazia. Essas precauções foram tomadas para minimizar possíveis interferências nos resultados da análise de composição corporal, garantindo maior precisão na avaliação dos tecidos magros, gordurosos e ósseos.

3.3.3. Avaliação da força muscular – Teste de uma repetição máxima (1-RM)

A força muscular foi avaliada por meio do teste de 1-RM (uma repetição máxima), seguindo os procedimentos descritos pela ASEP (BROWN; WEIR, 2001). O exercício escolhido para a realização do teste foi o *Leg Press* 180° (G3-PL70, Matrix®, São Paulo, Brasil). Antes da realização do teste, foi feita uma sessão de familiarização, durante a qual a posição dos pés e a amplitude de flexão dos joelhos de 90° foram ajustadas e registradas para cada participante. Isso foi feito para garantir a padronização do posicionamento nas avaliações subsequentes.

Antes de iniciar os testes, as participantes realizaram um aquecimento geral de cinco minutos na bicicleta ergométrica. Em seguida, foi realizado um aquecimento específico, que consistiu em uma série de 10 repetições a 50% do valor estimado de 1-RM, seguido por uma série de três repetições a 70% do 1-RM estimado. Após um intervalo de três minutos, o teste foi iniciado para determinar a máxima quantidade de peso que a participante poderia levantar em um ciclo completo de flexão e extensão da articulação dos joelhos, com amplitude de movimento de 90°.

O número total de tentativas para determinar o valor de 1-RM em cada teste não excedeu cinco. Entre as tentativas, foi mantido um intervalo de descanso de três minutos. Durante a execução do movimento, o avaliador forneceu encorajamento verbal para motivar a participante a atingir seu máximo desempenho.

3.3.4. Aptidão cardiorrespiratória – Teste de consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$)

Para a avaliação da aptidão aeróbia, as participantes realizaram um teste incremental em uma bicicleta ergométrica para membros inferiores (CG-04, Inbramed, Porto Alegre, Brasil). O

protocolo iniciou com uma carga de 10-30W, com aumentos de 10W a cada minuto até a exaustão voluntária da participante ou até que a participante não conseguisse manter a cadência de 60-75 rpm por mais de cinco segundos (CONCEIÇÃO et al., 2019). Ao final de cada estágio, as participantes informaram sua percepção subjetiva de esforço, conforme a escala de Borg (BORG, 1970).

Durante todo o teste, a ventilação e as trocas gasosas (respiração a respiração) foram coletadas por meio de um sistema metabólico de análise de gases (Quark CPET, Cosmed, Roma, Itália). A partir deste teste, foram identificados marcadores de capacidade e potência aeróbia, os quais foram utilizados tanto para avaliar a efetividade do programa de treinamento na aptidão aeróbia, quanto para a prescrição da intensidade do treinamento aeróbio.

O ponto de compensação respiratória (PCR) foi considerado como marcador de capacidade aeróbia. Este ponto foi identificado como a carga correspondente à quebra na linearidade da relação entre ventilação e produção de dióxido de carbono ($\dot{V}CO_2$) (BEAVER; WASSERMAN; WHIPP, 1986; MEYER et al., 2004; SIMON et al., 1983). A identificação do PCR foi realizada de forma independente por dois avaliadores experientes; em caso de discordância, um terceiro avaliador foi consultado.

Como marcador da potência aeróbia, foi utilizado o consumo de oxigênio pico ($\dot{V}O_{2\text{pico}}$) e a potência aeróbia máxima (PAM). O $\dot{V}O_{2\text{pico}}$ foi considerado a maior média de 30 segundos (valores médios a cada segundo), medida ao final do teste. A determinação da PAM foi feita com base na potência máxima atingida durante o teste. Quando a participante não finalizou o estágio de um minuto, a potência foi relativizada conforme o tempo de permanência no estágio, calculada pela fórmula: $PAM = \text{potência no último estágio} + (15 \text{ watts} \times \text{tempo no último estágio} / 60 \text{ segundos})$.

Para assegurar que as participantes realizaram o esforço máximo no teste, pelo menos dois dos três critérios a seguir foram adotados: (1) razão de trocas respiratórias maior que 1,0; (2) frequência cardíaca máxima ($FC_{\text{máx}}$) superior a 90% do máximo predito para a idade (HOWLEY; BASSETT; WELCH, 1995); (3) percepção subjetiva de esforço maior ou igual a 16. Além disso, ao longo de todo o teste, a saúde cardiovascular das participantes foi monitorada por meio de um eletrocardiograma, com acompanhamento de um médico responsável.

3.4. Protocolo de exercícios

3.4.1. Protocolo de treinamento combinado (TC)

A prescrição do protocolo de treinamento combinado seguiu as diretrizes do *American College of Sports Medicine* (CAMPBELL et al., 2019). Cada sessão de treinamento iniciou com um aquecimento de 5 minutos na bicicleta ergométrica, com intensidade correspondente a 50% do ponto de compensação respiratória (PCR). Em seguida, foi realizado o protocolo de treinamento de força (TF), composto por cinco exercícios, sempre na mesma ordem: *leg press* a 180°, supino reto, extensão de joelho na cadeira extensora, flexão de joelho na cadeira flexora e puxador dorsal. As participantes realizaram de 3 a 4 séries de 8 a 12 repetições máximas (RM), com intervalo de dois minutos entre as séries. A carga foi progressivamente ajustada em cada série, para que as participantes mantivessem o exercício dentro da zona alvo de repetições máximas (8-12).

Após o TF, as participantes realizaram o treinamento aeróbio (TA), baseado no treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) na bicicleta ergométrica. O TA consistiu em completar 3-5 séries de 2 min realizados no Delta 50% (é acrescida à carga da potência aeróbia máxima 50% do valor da diferença da carga entre a potência aeróbia máxima e o PCR; aproximadamente 90% do VO_2 máx), com intervalo de 2 min de recuperação ativa (20% do PCR). Caso o PCR não fosse identificável a partir do teste de consumo máximo de oxigênio (e.g., ausência de inflexão na curva VE/VCO₂), a participante realizava as séries a 100% da PAM. Após a última série, realizava-se 2 minutos a 20% da carga do PCR. Essa prescrição do treino aeróbio está embasada em trabalhos anteriores que aplicaram HIIT, mas se pautou principalmente no fato de considerar a variabilidade biológica das pacientes ao utilizarmos o valor de delta. Recentemente, publicamos um artigo de revisão onde avaliamos as variáveis que devem ser consideradas para a prescrição do HIIT para pacientes oncológicos (APÊNDICE I) (DIAS-DA-SILVA et al., 2024).

3.5. Coleta de material biológico

3.5.1. Coletas de sangue

As participantes do estudo foram orientadas a comparecer às sessões de coleta de sangue bem hidratadas e alimentadas. Amostras de sangue foram obtidas da veia antecubital antes e após

a sessão de TC. Foram coletados 10 tubos de 4ml, utilizando tubos para coleta de sangue a vácuo com EDTA k3. As amostras foram imediatamente separadas em alíquotas, e o processamento do plasma ocorreu no mesmo dia, o mais rápido possível após a coleta. O protocolo incluiu quatro etapas de centrifugação com tempos e velocidades distintas para garantir um plasma *platelet-free*. Após a última centrifugação, o plasma foi reservado em alíquotas de 2 mL e armazenado a -80°C até as análises de c-miRNA.

3.6. Avaliações – Variáveis dependentes

A principal variável dependente do estudo foi a expressão de c-miRNAs relacionados à inflamação, incorporados em VEs em mulheres com câncer de mama.

3.6.1. Análise de c-miRNAs em VEs

3.6.1.1. Procedimento de centrifugação para preparação do plasma sanguíneo

O protocolo inicial de centrifugação para separação do plasma sanguíneo consistiu em quatro etapas. Na primeira etapa, todos os tubos de sangue, com exceção do primeiro tubo coletado, foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para novos tubos, evitando a fração celular. Em seguida, o sobrenadante e o primeiro tubo de sangue coletado foram submetidos a uma segunda centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos, com o objetivo de coletar alíquotas de plasma para análises adicionais de citocinas, não incluídas nesta dissertação. Após essa segunda etapa, os sobrenadantes foram submetidos a uma terceira centrifugação, agora a 2500 x g por 10 minutos. Por fim, uma quarta centrifugação foi realizada a 2500 x g por 15 minutos. Ao término dessa última centrifugação, o plasma foi alíquotado em tubos de 2 ml para minimizar ciclos de congelamento e descongelamento e, em seguida, armazenado a -80°C. Essas etapas múltiplas de centrifugação foram necessárias para obter um plasma livre de plaquetas (MCILVENNA et al., 2023), pois estudos indicam que plaquetas residuais, caso não sejam removidas completamente durante o processamento, podem liberar VEs *ex vivo* (KARIMI et al., 2022; MCILVENNA et al., 2023).

3.6.1.2. Isolamento das VEs

Os procedimentos seguiram as diretrizes metodológicas mais recentes e amplamente aceitas na literatura sobre o tema (WELSH et al., 2024). As VEs foram isoladas por cromatografia de exclusão por tamanho, utilizando colunas qEV1/35nm e um Coletor Automático de Frações (AFC) da IZON Science, conforme o protocolo do fabricante (IZON Science). Inicialmente, o plasma livre de plaquetas foi descongelado à temperatura ambiente e centrifugado a 1500 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e submetido a uma centrifugação de 10000 x g por 10 minutos. Após isso, 1 ml do plasma foi aplicado na coluna qEV1/35nm, e 12 frações de 700 µl foram eluídas em tampão fosfato-salino (PBS) e coletadas em 12 tubos separados. As frações ricas em VEs (F1-4) e as frações pobres em VEs (F9-12) foram combinadas e concentradas em aproximadamente 150 µl, utilizando filtros Amicon Ultra-15 100 kDa MWCO, por centrifugação a 4000 rpm durante 15-20 minutos.

3.6.1.3. Caracterização e quantificação das vesículas

3.6.1.3.1. Quantificação da concentração de proteínas

Os *pools* concentrados das frações F1-4 e F9-12, resultantes do processo de isolamento, foram então quantificados quanto à concentração de proteínas utilizando o aparelho Qubit 4 e o kit *Qubit Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), conforme as instruções do fabricante.

3.6.1.3.2. Análise de rastreamento de nanopartículas - *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

A distribuição de tamanho e a concentração das partículas nas amostras ricas em vesículas foram analisadas usando o equipamento *NanoSight* NS300. As configurações foram ajustadas conforme o manual do fabricante (Manual do Usuário do NanoSight NS300, MAN0541-01-EN-00, 2017): o nível da câmera foi definido para garantir que todas as partículas estivessem claramente visíveis, evitando uma saturação de sinal superior a 20%. O limiar de detecção foi ajustado para incluir o máximo possível de partículas, garantindo que entre 10 e 100 cruces vermelhas fossem detectadas, enquanto a contagem de cruces azuis foi limitada a 5. O foco foi

ajustado para evitar partículas pouco definidas. Em cada medição, foram capturados cinco vídeos de 30 segundos a uma temperatura de 25°C, com inserção manual das amostras no compartimento de análise. Os parâmetros da câmera foram mantidos constantes em todas as capturas. Após a captura, os vídeos foram analisados no software *NanoSight NTA 3.1 Build 3.1.46*, com um limiar de detecção de 5. Especificações do hardware: laser embutido de 45 mW a 488 nm e câmera sCMOS.

3.6.1.3.3. Análise de vesículas diretamente no plasma sanguíneo - Sensoriamento por imagem interferométrica de partícula única (SP-IRS) e imunofluorescência

Para quantificar diretamente as VEs no plasma de pacientes com câncer de mama, foi realizada uma análise de captura imunológica baseada em fluorescência para partículas únicas em cada amostra de plasma, utilizando a tecnologia de sensoriamento por imagem interferométrica de partícula única (SP-IRS) e imunofluorescência (Leprechaun/Simoa) (MCILVENNA et al., 2023). Essa análise foi conduzida no laboratório do Dr. Martin Whitham, na Universidade de Birmingham. O Dr. Whitham é especialista em análise de pequenas vesículas extracelulares, incluindo o uso das tecnologias SP-IRS e imunofluorescência (Leprechaun/Simoa), e no estudo de proteínas associadas à sinalização intertecdual durante o exercício em contextos de saúde e doença. As análises foram conduzidas conforme descrito previamente (MCILVENNA et al., 2023) e seguiram o protocolo do fabricante.

3.6.1.3.4. Western Blotting

Inicialmente, a concentração total de proteínas nos *pools* das frações purificadas por SEC foi medida usando o kit *Qubit™ Protein Broad Range (BR) Assay (Invitrogen™)*, seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram então diluídas em tampão Laemmli, aquecidas a 95°C por 5 minutos e armazenadas a -20 °C até o uso. Em seguida, 15 µl de cada amostra contendo 10 µg de proteína foram aplicados em géis de poliacrilamida–SDS (SDS-PAGE) de 8-10% e submetidos à eletroforese (80V por 30 minutos, seguido de 110V até a corrida completa). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF overnight a 4°C, sob voltagem de 25V. As membranas foram bloqueadas por 30 minutos com *StartingBlock T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific™)* e incubadas *overnight* a 4°C com os respectivos anticorpos

primários, diluídos no mesmo tampão de bloqueio e sob agitação leve. No dia seguinte, o excesso de anticorpo primário foi removido, e as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T por 5 minutos em temperatura ambiente, com agitação leve. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários por 1 hora em temperatura ambiente, também em agitação leve, e lavadas novamente em TBS-T (3x/5min). A detecção foi realizada com o *ChemiDoc Imaging System* (Bio-Rad) usando o kit ECL Plus®, conforme o protocolo do fabricante.

Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD63 (1:1000, Santa Cruz (MX-49.129.5) sc-5275, monoclonal de camundongo), Anti-CD81 (1:1000, Abcam [EPR4244] ab109201, monoclonal recombinante de coelho), Anti-Alix (1:1000, Cell Signaling - (E6P9B) #92880, monoclonal de coelho), Anti-ApoA1 (1:1000, Invitrogen - (PA5-29557), policlonal de coelho) e Anti-ApoB (1:500, Abcam (ab20737), policlonal de coelho). Os anticorpos secundários foram Anti-rabbit IgG HRP-conjugado da Amersham™ e Anti-mouse IgG HRP-linked (#7076, Cell Signaling).

3.6.2. Expressão de miRNAs associados a VEs

3.6.2.1. Extração de RNA de VEs

O RNA foi extraído das frações ricas em VEs isoladas previamente, utilizando um protocolo modificado e otimizado no nosso laboratório. Esse protocolo é uma combinação dos métodos *TRIzol* (Invitrogen) e *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (Qiagen). Após o isolamento, as frações ricas em vesículas foram concentradas ao máximo, com o objetivo de obter um volume final de 150 µl ou menos, garantindo a maior concentração possível de VEs para a extração de RNA. Para o processo, foi adicionado *TRIzol* à amostra em uma proporção de 1:10 (10% de amostra para 90% de *TRIzol*). A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto para homogeneização, seguida de uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 20% de clorofórmio, seguido de uma nova agitação por 30 segundos e outra incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, antes da centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi cuidadosamente coletada.

A purificação do RNA foi realizada usando o protocolo *Quick-Start* do *Kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced*, com algumas adaptações. O sobrenadante foi transferido para um novo

tubo, ao qual foi adicionado isopropanol em volume igual, seguido de agitação em vórtex. Até 700 µl da amostra foram então passados pela coluna *RNeasy UCP MinElute*, com centrifugações de 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ até que toda a amostra tivesse passado pela coluna. Em seguida, 700 µl de *Buffer RWT* foram adicionados à coluna e centrifugados por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$, descartando o filtrado. Posteriormente, a coluna foi lavada com 500 µl de *Buffer RPE*, novamente centrifugada e com o filtrado descartado. Para a próxima etapa, 500 µl de etanol 80% foram adicionados à coluna, seguidos de uma centrifugação de 2 minutos a $\geq 8000 \times g$. O filtrado e o tubo de coleta foram descartados. A coluna foi então transferida para um novo tubo de coleta de 2 ml e centrifugada em velocidade máxima por 5 minutos para secar a membrana completamente, com o filtrado e o tubo de coleta descartados.

Para a eluição, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml, onde 20 µl de água livre de *RNase* foram aplicados ao centro da membrana, seguida de uma incubação de 1 minuto e centrifugação de 1 minuto em velocidade máxima. Para aumentar o rendimento, o eluido foi recolhido e reaplicado na coluna para uma segunda centrifugação. O RNA extraído foi então congelado a -80°C até o uso.

3.6.2.2. Controle de Qualidade

Após a extração, as amostras de RNA foram encaminhadas para o Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Unicamp, para análise de controle de qualidade, antes de serem enviadas para a Novogene, onde o sequenciamento de miRNAs foi realizado. No LaCTAD, a qualidade das amostras foi avaliada usando o *RNA Screen Tape System (Agilent)* na plataforma *Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies)*, seguindo as orientações do fabricante. Em resumo, as amostras de RNA total foram descongeladas sobre gelo para evitar degradação. Para preparar o marcador de tamanho, 5 µL de *Buffer* de Amostra de RNA foram misturados com 1 µL de *RNA Ladder*. Do mesmo modo, cada amostra foi preparada combinando 5 µL de *Buffer* de amostra de RNA com 1 µL da amostra de RNA.

Após a preparação, as misturas foram centrifugadas e submetidas à agitação em um vórtex IKA a 2000 rpm por um minuto para homogeneização. Uma nova centrifugação foi realizada para assegurar que o conteúdo estivesse no fundo do tubo. Em seguida, para desnaturação, as amostras (incluindo o marcador) foram aquecidas a 72°C por 3 minutos e, posteriormente, colocadas sobre

gelo por 2 minutos para resfriamento. Após essa etapa, as amostras foram novamente centrifugadas para garantir o posicionamento adequado no fundo do tubo. Finalmente, as amostras preparadas foram carregadas no *Agilent 2200 TapeStation* para análise.

Com o controle de qualidade realizado no LaCTAD, as amostras de RNA extraído de VEs foram então enviadas à Novogene para o sequenciamento.

3.6.2.3. Sequenciamento de miRNAs

O sequenciamento de RNAs pequenos foi realizado pela empresa Novogene, seguindo os parâmetros padrão de sequenciamento: Biblioteca *Exosomal Small RNA Library*; Plataforma *NovaSeq X Plus Series*; Leitura do tipo *Single-end 50*; Profundidade de sequenciamento de ≥ 10 milhões de leituras por amostra. Resumidamente, ao chegarem ao laboratório da Novogene, as amostras foram novamente submetidas ao teste de controle de qualidade. Em seguida, adaptadores foram ligados às extremidades 3' e 5' do RNA pequeno para preparação. A primeira fita de cDNA foi então sintetizada por hibridização com um primer de transcrição reversa, gerando a biblioteca de cDNA de fita dupla por meio de um enriquecimento por PCR.

Após a purificação e seleção por tamanho, as bibliotecas com inserções entre 18 e 40 pb estavam prontas para o sequenciamento na plataforma *Illumina (SE50)*. A qualidade da biblioteca foi verificada com o Qubit e PCR em tempo real para quantificação e por um bioanalisador para detectar a distribuição de tamanho das sequências. Em seguida, as bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas nas plataformas *Illumina*, de acordo com a concentração final da biblioteca e a quantidade de dados necessária para o estudo.

A partir dos dados obtidos do sequenciamento, o mapeamento dos miRNAs foi realizado usando a base de dados *miRBase* (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019), com o genoma humano como referência. Após a preparação e controle de qualidade dos dados de pequenos RNAs associados às vesículas extracelulares, as sequências foram alinhadas ao genoma humano e identificadas com base nas anotações da *miRBase*. A obtenção dos valores quantitativos dos miRNAs foi conduzida por meio da ferramenta *sRNAtoolbox* (APARICIO-PUERTA et al., 2019), utilizando a função "*bench*" em formato de "*single assignment*" para garantir a atribuição de cada leitura a um único miRNA, maximizando a especificidade na quantificação dos níveis de expressão.

Para uma avaliação precisa das variações de expressão, as leituras foram normalizadas por *Reads Per Million* (RPM) por biblioteca, o que permitiu uma análise relativa das mudanças na expressão de miRNAs ao controlar diferenças na profundidade de sequenciamento entre as amostras.

3.6.3. Análise diferencial e *in silico*

Para as análises *downstream*, consideramos as médias de RPM+1 dos miRNAs maduros para calcularmos o *fold-change* (FC) e \log_2FC da expressão dos miRNA, mensurando a alteração de expressão do momento pós-exercício em relação ao pré-exercício ($FC = \text{Pós/Pré}$). Como a análise foi realizada em amostras agrupadas (*pool*), não foi possível realizar uma análise estatística formal de expressão diferencial, sendo as variações exploradas descritivamente. Sendo assim, utilizamos o FC como parâmetro de corte para determinarmos genes que poderiam estar diferencialmente regulados devido ao desvio em relação a função $f(x) = x$. Assim, consideramos como miRNA diferencialmente expressos aqueles que apresentavam $-1.5 < \log_2FC < 1.5$.

A fim de sabermos quais genes são modulados pelos miRNAs diferenciais e, portanto, inferirmos as vias associadas a ação desses miRNAs, realizamos uma análise *in silico*, confrontando nossos dados contra a base de dados *miRTarBase*. Para essa análise, filtramos os genes-alvos (*target*) considerando os miRNA diferencialmente expressos para construirmos uma rede e analisarmos o dado dentro de uma ótica de biologia de sistemas utilizando os softwares Gephi e Cytoscape (SHANNON et al., 2003). Enquanto utilizamos o *Gephi* (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009) para cálculo de parâmetros de redes, como grau (*degree*) e busca por comunidades (Algoritmo de Louvain), o Cytoscape foi utilizado para interpretação biológica da rede através das análises de enriquecimento. As análises de enriquecimento foram realizadas contra o banco de dados *KEGG* (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto) (KANEHISA et al., 2024) e *Reactome* (MILACIC et al., 2024). Para a construção do mapa de enriquecimento, utilizamos o *EnrichmentMap* (MERICCO et al., 2010). Os demais gráficos e representações da análise diferencial e *in silico* foram realizados utilizando linguagem de programação *Python* (v. 3.11).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das pacientes

A tabela 1 mostra as características gerais das 12 pacientes incluídas no estudo.

TABELA 1. Características das pacientes no momento inicial (*baseline*).

(*continua*)

Características iniciais	Pacientes (n=12)
Idade, anos, média ± DP	44,42 ± 6,41
Composição corporal, média ± DP	
Peso, kg	98,67 ± 9,1
IMC, kg/m ²	31,53 ± 6,92
Gordura corporal, %	44,96 ± 8,75
Massa total, kg	82,58 ± 17,23
Massa livre de gordura, kg	45,51 ± 4,96
Avaliações funcionais, média ± DP	
1-RM, kg	89,26 ± 28,12
VO ₂ máx, mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹	20,37 ± 4,24
Menopausa, N	
Sim	4
Não	8
Raça, N	
Branca	8
Parda	4
Escolaridade, N	
Fundamental incompleto	1

(continuação)

Fundamental completo	1
Ensino médio completo	4
Superior incompleto	2
Superior completo	3
Ignorado	1
Ocupação remunerada, N	
Sim	5
Não	6
Ignorado	1
Tabagismo, N	
Sim	0
Não	12
Gestações, N, média ± DP	1,67 ± 1,60
Diabetes, N	
Sim	1
Não	11
Hipertensão arterial, N	
Sim	2
Não	10
Status do receptor, N	
ER/PR+, HER2-	6
ER/PR, HER2 indeterminado (escore 2+)	1
ER/PR±, HER2+	4
Triplo negativo	1

(conclusão)

Ki67, %, média ± DP

44,58 ± 23,31

DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corporal; ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; HER2 + ou -: receptor do fator de crescimento epidérmico humano positivo ou negativo; Ki67: marcador de proliferação celular tumoral.

4.2. Efeitos de uma sessão de TC nos níveis sistêmicos de VEs em pacientes com câncer de mama

Após o processamento, o plasma das 12 pacientes foi dividido em dois *pools* - pré-exercício e pós-exercício - utilizando-se a mesma quantidade de plasma de cada paciente para obter um volume total de pelo menos 1 ml em cada *pool* para a purificação de VEs.

Os *pools* de plasma foram então submetidos à purificação de VEs por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), e as quatro primeiras frações coletadas foram combinadas, resultando em duas amostras enriquecidas em VEs: F1-4 pré-exercício e F1-4 pós-exercício. Essas amostras foram analisadas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) para determinar a concentração e o perfil de tamanho das partículas. A análise NTA revelou uma maior concentração de partículas na amostra F1-4 pós-exercício ($7,69 \times 10^{11} \pm 5,40 \times 10^{10}$ partículas) em comparação com a amostra F1-4 pré-exercício ($4,89 \times 10^{11} \pm 9,58 \times 10^{10}$ partículas), com tamanhos médios de partículas semelhantes entre as frações (F1-4 pré-exercício: $162,22 \pm 8,75$ nm; F1-4 pós-exercício: $157,46 \pm 9,03$ nm), como mostrado na **Figura 4**.

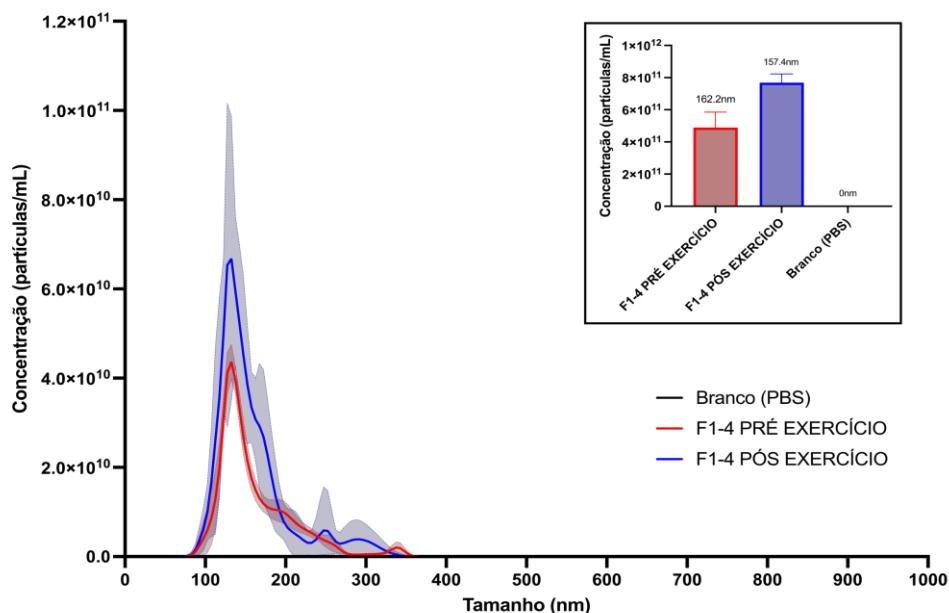


FIGURA 4. Concentração e perfil de tamanho de partículas em amostras purificadas de plasma de pacientes com câncer de mama, obtidas por SEC antes e após uma sessão de TC. Os dados foram adquiridos por análise de NTA utilizando o equipamento *NanoSight* NS300. Na análise em vermelho, são apresentadas as frações 1-4 derivadas de um *pool* de amostras de plasma coletadas das pacientes em estado basal, antes da sessão de TC. Em azul, as frações 1-4 correspondem ao *pool* de amostras de plasma coletadas imediatamente após uma sessão de TC. A linha em preto representa a análise de uma amostra de PBS, utilizada como controle ("branco"). Cada *pool* foi composto por amostras de plasma de 12 pacientes.

Para avaliar a presença de VEs, proteínas plasmáticas e possíveis contaminantes de lipoproteínas nas frações isoladas (F1-4 pré-exercício, F1-4 pós-exercício, F9-12 pré-exercício e F9-12 pós-exercício), foi realizada uma análise de *Western Blotting* com marcadores conhecidos de VEs (CD63 e CD81) juntamente com marcadores de lipoproteínas (ApoA1 e ApoB) e ALIX (**Figura 5**). Conforme esperado, a proteína tetraspanina CD63 estava mais enriquecida nas frações 1-4 do que nas frações 9-12. A tetraspanina CD81, comumente enriquecida em membranas de VEs pequenas (~50-100 nm de diâmetro), foi detectada em todas as frações analisadas, tanto nas frações 1-4 quanto nas frações 9-12. Em relação aos marcadores de lipoproteínas, observou-se que ApoA estava presente em todas as amostras de forma semelhante, enquanto ApoB parecia mais enriquecida nas frações 1-4. Por fim, a proteína ALIX mostrou maior enriquecimento nas frações 9-12.

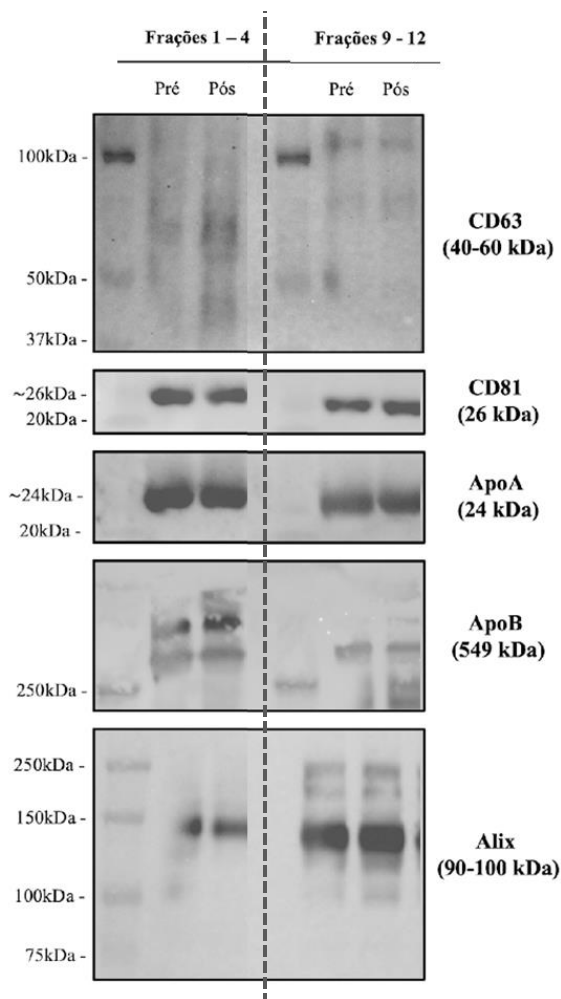


FIGURA 5. Caracterização de VEs em frações obtidas de pacientes com câncer de mama antes e após uma sessão de TC (pré e pós). Os *pools* das frações 1-4 e 9-12, purificados por SEC, foram analisados por *Western Blotting* para os marcadores CD63 (40-60 kDa), CD81 (26 kDa), ApoA (24 kDa), ApoB (549 kDa) e ALIX (90-100 kDa).

No protocolo que utilizamos, uma etapa final de concentração/filtragem das frações purificadas com colunas qEV1, recomendada pelo fabricante, pode adicionar variabilidade entre amostras. Apesar de a centrifugação com filtros Amicon Ultra-15 100kDa MWCO ser mantida constante (4000 rpm por 15-20 minutos), o volume final entre os tubos pode variar ligeiramente devido a diferenças inerentes entre amostras, limitando a comparação direta da concentração de partículas entre elas.

A análise dos níveis de partículas positivas para CD9, CD63 e CD81 revelou que as distribuições dos dados seguiram uma curva normal, conforme indicam os testes de normalidade *Shapiro-Wilk* para os valores pré e pós-exercício. Diferentemente da NTA, essa análise mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis de nenhum marcador entre os períodos pré e pós-exercício ($p > 0,05$ – **Figura 6**). A variação percentual média para CD9 foi de -5,49%, sugerindo uma leve diminuição nas concentrações após a sessão de TC. Para CD63, a variação percentual foi de -8,62%, e para CD81, -2,83%. Nenhuma partícula positiva foi detectada no controle negativo “*Mouse IgG*” em nenhum dos momentos analisados, o que confirma a especificidade dos ensaios e confirma que os resultados para CD9, CD63 e CD81 não foram afetados por reatividade inespecífica ou contaminação (**Figura 6**).

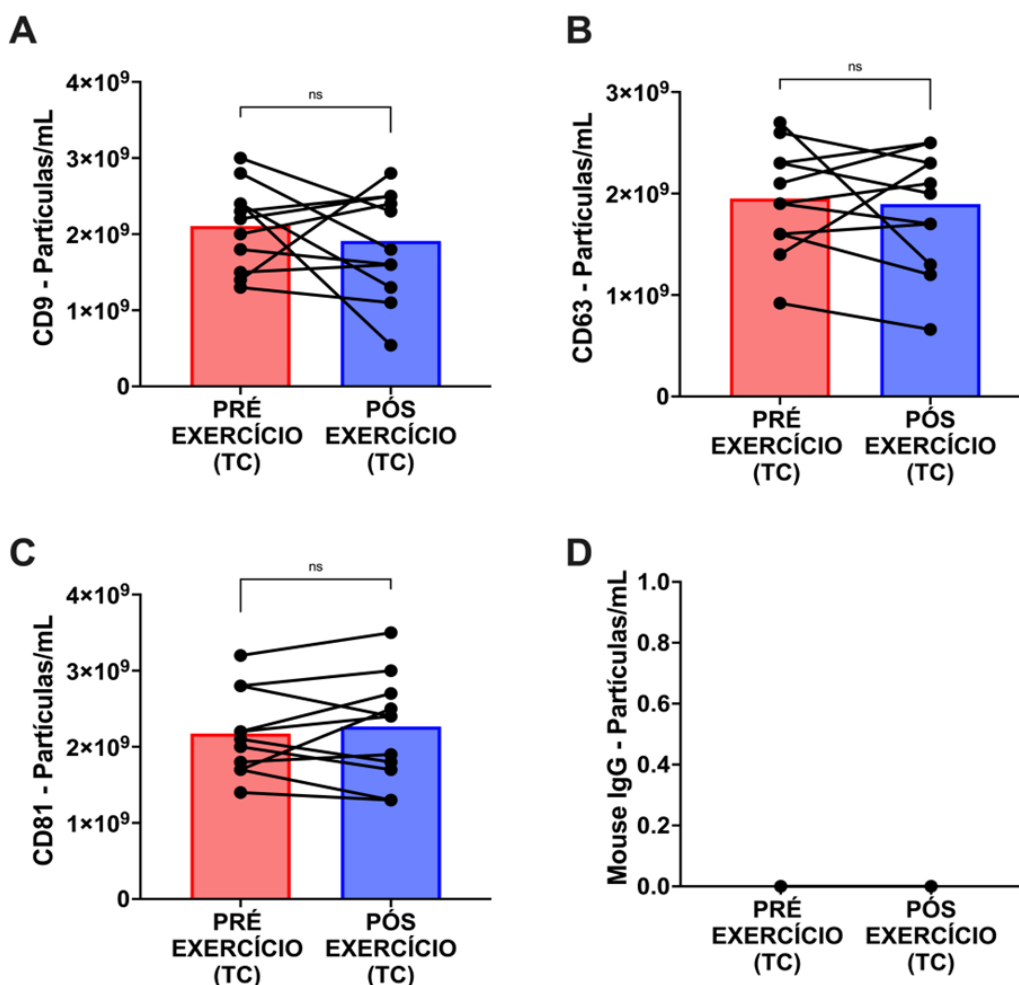


FIGURA 6. Contagem de partículas positivas para tetraspaninas no plasma livre de plaquetas de pacientes com câncer de mama antes e após uma sessão de treinamento combinado em estado destreinado. Os dados representam a soma das contagens de fluorescência dos anticorpos específicos para CD9, CD63 ou CD81 em todos os pontos de captura. A) Contagem de partículas positivas para o marcador CD9, B) Contagem de partículas positivas para o marcador CD63, C) Contagem de partículas positivas para o marcador CD81, e D) Contagem de partículas positivas para Mouse IgG (controle negativo). * $P < 0,05$ - Teste t pareado de Student.

Esses dados indicam que, diferentemente dos resultados sugeridos pela análise de NTA, não houve aumento significativo na concentração de VEs no plasma de pacientes com câncer de mama após uma sessão de TC.

4.3. Efeitos de uma sessão de TC na expressão de miRNAs associados a VEs

A fim de caracterizarmos as vesículas a nível molecular e determinar potenciais diferenças de expressão entre os períodos pré e pós, observamos que nossos dados apresentam resultados divergentes entre os métodos utilizados: enquanto o NTA indicou um aumento na concentração plasmática de VEs após uma sessão de TC em pacientes com câncer de mama, o SP-IRS não detectou alterações significativas. Considerando essas discrepâncias metodológicas, optamos por focar na análise do conteúdo molecular das VEs, investigando se a expressão de miRNAs associados a essas partículas pode responder de forma aguda ao TC, dado seu papel crucial na regulação de vias relacionadas ao desenvolvimento tumoral. Para testar a hipótese de que uma sessão de TC poderia modificar a expressão de miRNAs associados a VEs — potencialmente aumentando os miRNAs ligados à supressão tumoral (TSmiRs) e diminuindo os miRNAs envolvidos na progressão tumoral (oncomiRs) — realizamos o sequenciamento de RNAs pequenos. A análise foi conduzida no RNA extraído das frações F1-4 da purificação por SEC, usando o *pool* de plasma de 12 pacientes coletado antes e logo após a sessão de TC. A avaliação do efeito agudo de uma única sessão de TC revelou uma modulação na expressão dos miRNAs associados às VEs, evidenciando aumentos e reduções nesses reguladores.

Embora o uso de uma amostra em *pool* para cada momento limite as comparações estatísticas, temos uma maior complexidade das respostas ao TC, oferecendo uma visão ampla das possíveis mudanças nos miRNAs associados às VEs. Uma vez que realizamos o *pool* das amostras para cada momento – devido à baixa expressão de miRNAs, optamos por fazer isso para aumentar as chances de detecção dessas moléculas - a análise formal de expressão diferencial não foi realizada, pois comparações estatísticas entre grupos com N=1 não é viável. Em vez disso, calculamos o *fold-change* (FC) e o \log_2FC entre os momentos pré e pós-exercício para obter uma medida quantitativa preliminar das variações na expressão dos miRNAs.

No total, foram identificados 330 miRNAs nas amostras analisadas. Entre eles, 212 miRNAs foram detectados em ambos os momentos experimentais (pré e pós), indicando aqueles miRNAs que possuem expressão mesmo sob diferentes estados de treinamento. Além disso, foram observados 88 miRNAs que apresentavam expressão apenas para um dos momentos, dois quais 36 miRNAs eram exclusivos no momento pré e 52 miRNAs exclusivos no momento pós. Esses miRNAs específicos podem refletir perfis característicos de cada estado, sugerindo que certas

mudanças na expressão de miRNAs são atribuídas ao estado de repouso ou à resposta aguda ao exercício.

A **Figura 7a** apresenta uma visão geral da abundância dos miRNAs antes e após a sessão de TC, com os valores de abundância exibidos em escala logarítmica. Através do deslocamento da distribuição, observou-se que houve um aumento na abundância geral de miRNAs após o exercício. Esse deslocamento pode ser evidenciado através do gráfico *violin* (**Figura 7b**), que mostra que os quartis e a mediana da distribuição da abundância dos miRNAs apresentaram discreto aumento associado à intervenção.

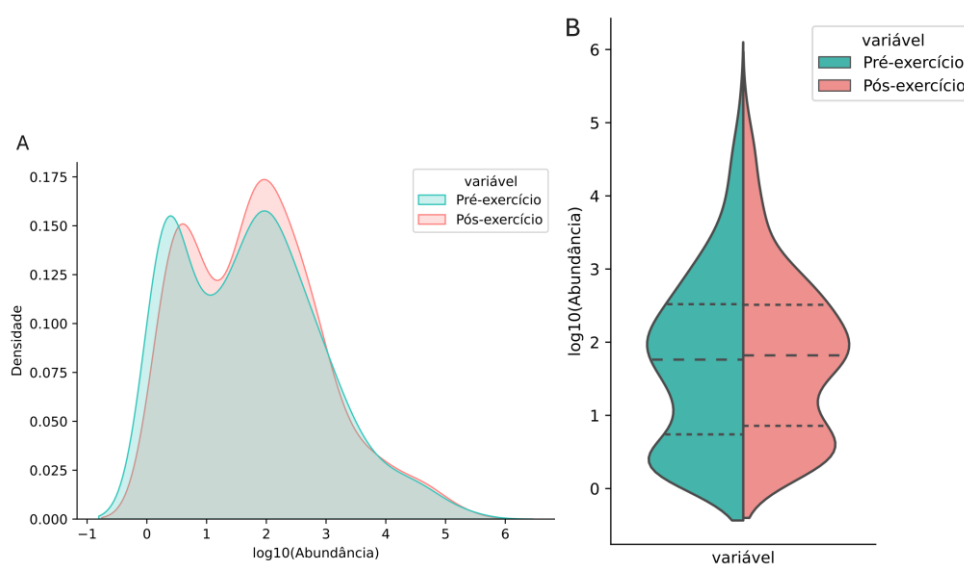


FIGURA 7. Abundância relativa dos miRNAs identificados antes e após a sessão de TC. A) Os valores de abundância estão representados em \log_{10} , com um aumento observado na abundância de miRNAs pós-exercício, evidenciado pelo deslocamento dos valores. B) Abundância apresentada por meio de um gráfico *violin*. Os quartis e a mediana da distribuição mostram um deslocamento para valores mais elevados no momento pós-exercício, sugerindo um discreto aumento na expressão dos miRNAs após a intervenção.

Para investigar mais a fundo os potenciais miRNAs diferencialmente expressos e diminuir a chance de variações técnicas ou biológicas não significativas, aplicamos um filtro de *fold-change* (FC), considerando como diferencialmente expressos os miRNAs com valores de $-1,5 < \log_2FC < 1,5$. Entre os miRNAs identificados, os que mostraram maior regulação positiva (*top up-regulated*) foram hsa-miR-543 ($\log_2FC = 7,71$), hsa-miR-126-5p ($\log_2FC = 7,60$), hsa-miR-1228-5p ($\log_2FC = 7,52$), hsa-miR-664a-5p ($\log_2FC = 7,30$) e hsa-let-7b-3p ($\log_2FC = 7,28$). Em contraste, os miRNAs mais regulados negativamente (*top down-regulated*) foram hsa-miR-381-3p ($\log_2FC = -$

8,76), hsa-miR-505-5p ($\log_2FC = -7,50$), hsa-miR-148a-5p ($\log_2FC = -7,07$), hsa-miR-379-5p ($\log_2FC = -6,90$) e hsa-miR-3175 ($\log_2FC = -6,77$). Esses resultados sugerem padrões diferenciais de expressão de miRNAs relacionados ao exercício físico, indicando potenciais candidatos que podem desempenhar papéis importantes nas respostas ao exercício ou na biologia do câncer.

A **Figura 8a** é um gráfico de dispersão que representa os miRNA e suas abundâncias, comparando pré e pós exercício. Nesse gráfico, observa-se que os miRNAs de expressão constante (não diferencialmente regulados) compõem 50% dos dados e apresentam uma correlação positiva entre os períodos pré e pós-exercício ($n = 166$, $R^2 = 0,95$, pontos cinzas), o que fica evidente pela proximidade com a linha da função $f(x) = x$. No entanto, ao considerar também os miRNAs diferencialmente regulados, a correlação entre os momentos pré e pós-exercício diminuiu consideravelmente ($R^2 = 0,45$), devido a influência da variação de *fold-change* observada em alguns miRNAs. Para ilustrar essa diferença, o gráfico *MA* da **Figura 8b** exibe o \log_2FC em função da média da abundância, destacando que os pontos com maior deslocamento, que contribuem para a redução do R^2 , correspondem aos miRNAs *up-regulated* (em vermelho) e *down-regulated* (em azul).

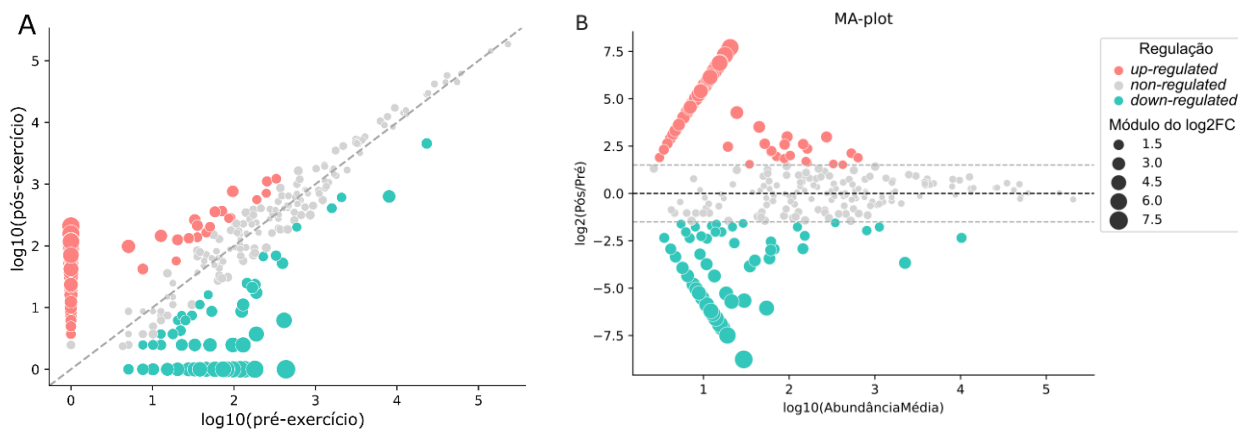


FIGURA 8. Gráfico de dispersão para análise de expressão diferencial e os níveis de expressão diferencial. A) Níveis de expressão em escala logarítmica dos miRNAs nos diferentes momentos (pré e pós-exercício). Observa-se uma forte correlação positiva entre o período pré e pós-exercício ($R^2 = 0,95$), com 50% dos miRNAs apresentando pontos próximos à linha $f(x) = x$ (pontos cinzas). B) O gráfico *MA* mostra o \log_2FC em função da média da abundância, evidenciando miRNAs *up-regulated* (em vermelho) e *down-regulated* (em azul), os quais contribuem para a maior variação do dado.

Para compreender os mecanismos bioquímicos e funcionais associados a esses miRNAs, analisamos os genes diferencialmente expressos em comparação com os dados disponíveis no banco de dados *miRTarBase*. O *miRTarBase* cataloga miRNAs e seus mRNAs-alvo, incluindo apenas interações que foram experimentalmente validadas. Com base nessa análise, construímos uma rede de interação miRNA-alvo contendo 1596 interações entre os miRNAs diferencialmente regulados e seus respectivos mRNAs. Para reduzir a complexidade dessa rede, aplicamos uma análise de modularidade e selecionamos os módulos com pelo menos 2 miRNAs, revelando 21 regiões de alta densidade de conexões (**Figura 9a**), ou seja, comunidades de interação dos miRNAs. Em cada um dos 21 módulos, nomeamos a comunidade com base no miRNA de maior grau (*degree*, ou seja, número de conexões) dentro do respectivo módulo.

Para aprofundarmos nas características de cada módulo, realizamos uma análise quantitativa dos módulos a fim de obter: o miRNA com maior grau em cada módulo, número de nós por módulo, o grau médio dos miRNA, e o número de miRNAs em cada módulo. Com isso, plotamos esses dados em um *heatmap* (**Figura 9b**) que evidencia a diversidade encontrada em cada uma das comunidades. Em negrito encontram-se os módulos com características marcantes na rede. Enquanto o miR-34a-5p apresenta o maior grau da rede (132), o módulo do miR-1-3p apresenta o maior número de nós. Além disso, é possível notar que 5 comunidades apresentam o valor máximo de miRNA por comunidade (6), sendo que o miR-146a-5p é o que possui o maior número de conexões. Curiosamente, o módulo do miR-19a-3p apresentou um grau médio por miRNA maior que o grau máximo, o que pode ser explicado pelo elevado número de nós presente em todos os outros miRNA da rede. Visto que os miRNAs aqui destacados possuem altos níveis de conexão e/ou estão localizados em módulos de alta densidade de conexões, provavelmente estas comunidades são as que podem apresentar maior associação com a biologia do câncer de mama.

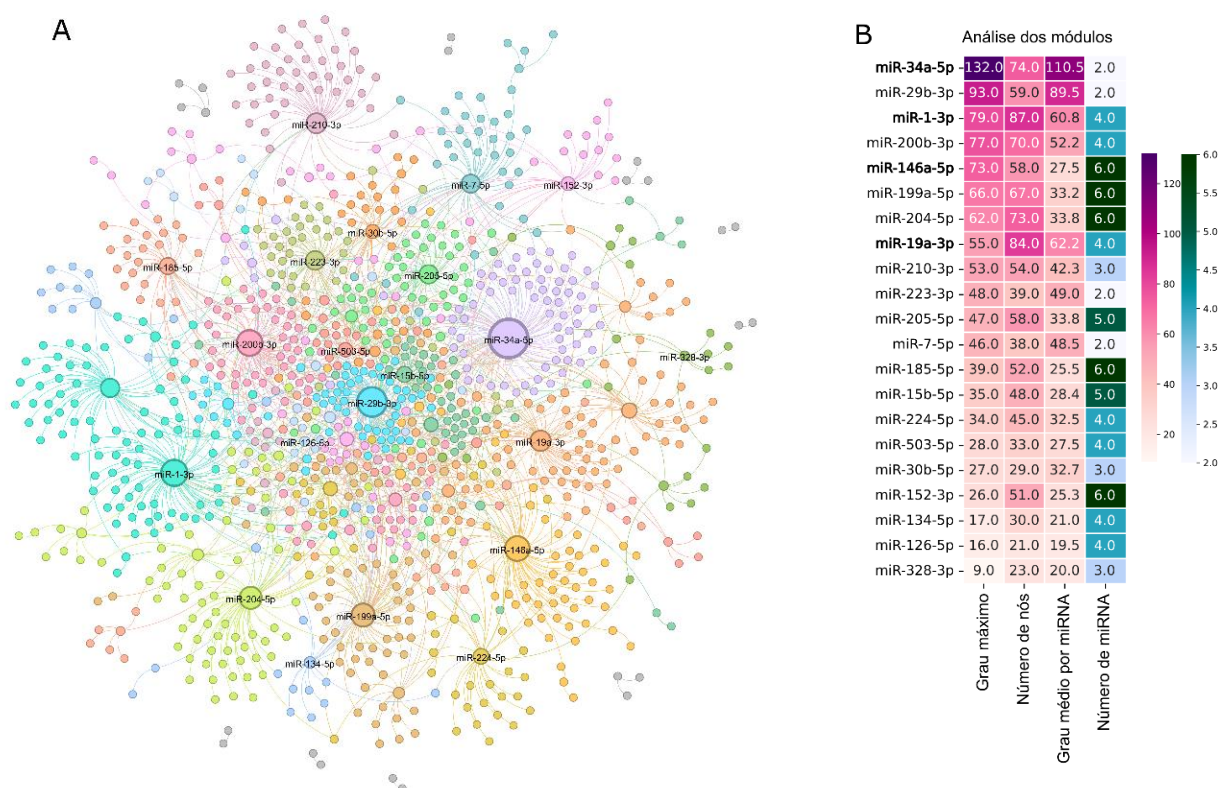


FIGURA 9a. Análise Biologia de Sistema para a rede de interação miRNA-mRNAalvo. A) A análise revelou 21 módulos, representados em diferentes cores. Os miRNAs em destaque são aqueles com maior número de conexões em cada módulo. B) *Heatmap* com análise das comunidades, evidenciando aqueles com mais conexões com genes-alvo (grau máximo), a quantidade de nós em cada módulo, o número médio de conexões por miRNA e o número do miRNA no mesmo módulo.

4.4. Enriquecimento de vias

Para investigarmos como os miRNA poderiam modular vias biológicas através da sua ação nos respectivos mRNA-alvos, realizamos uma análise de enriquecimento confrontando estes mRNAs contra os bancos de dados *KEGG* e *Reactome*. Nesta análise identificamos 912 vias moduladas pelos mRNAs e que, portanto, poderiam ser moduladas pelos miRNAs diferencialmente regulados no nosso estudo.

Devido à massiva quantidade de dados gerados pelo enriquecimento, utilizamos a abordagem de mapa de enriquecimento para representar todos os termos enriquecidos em uma única rede (**Figura 10a**). O mapa de enriquecimento (*heatmap*) calcula a similaridade entre os termos

enriquecidos e, ao aplicar um corte de similaridade, essa abordagem nos permite estabelecer arestas que unam os termos e estruturam a rede. Com essa análise, além de podermos avaliar o panorama global e destacar as vias com menores p-valores, também conseguimos identificar módulos e reduzir a redundância dos resultados de enriquecimento. Nessa perspectiva, três módulos principais podem ser visualizados no centro na rede, os quais estão associados à via de sinalização EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico), FGFR (Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos) e câncer. Vale ressaltar que um dos termos contidos dentro do módulo de cânceres é o “*Breast Cancer*”, mostrando que os miRNA diferencialmente regulados nesta análise apresentam a capacidade de modular aspectos moleculares já descritos para o câncer de mama. Além disso, quando olhamos para os 20 termos com menor p-valor (**Figura 10b**), podemos notar uma variedade de vias que podem ser moduladas por esses miRNAs, incluindo vias associadas ao câncer, a transdução de sinal, a transcrição, e ao sistema imune.

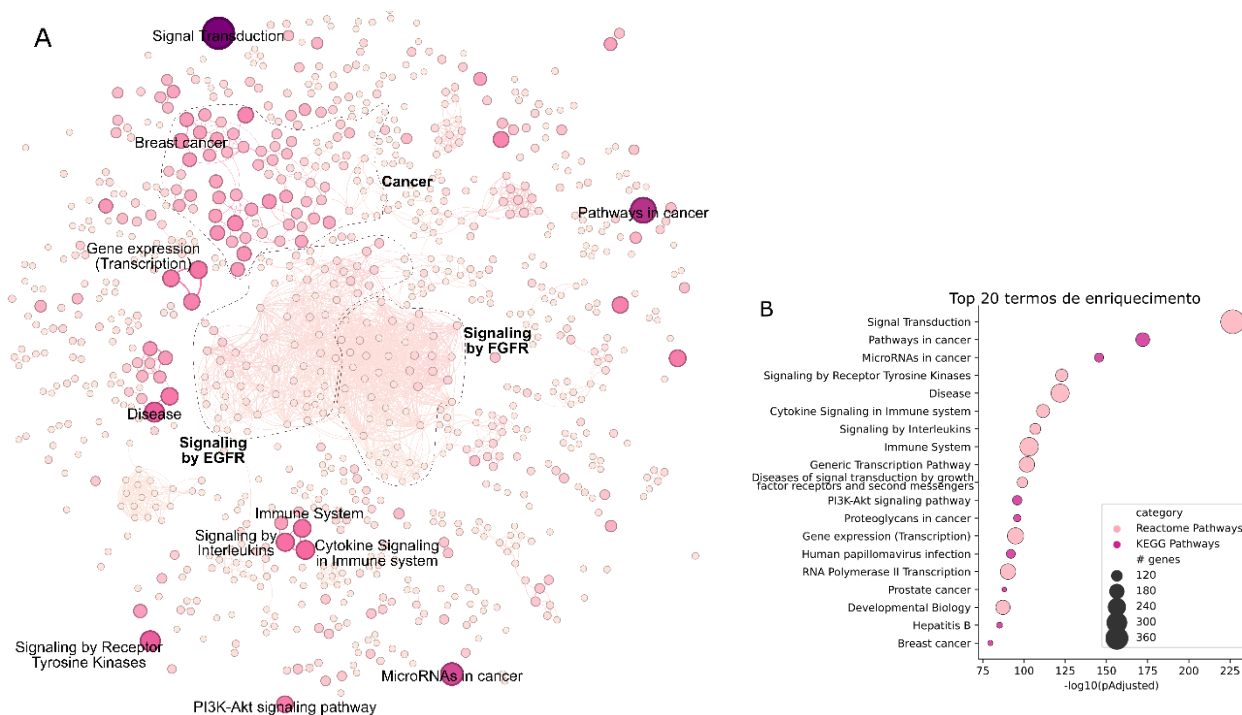


FIGURA 10. Análise de enriquecimento de termos para miRNAs diferencialmente regulados. A) Mapa de enriquecimento representando todos os termos enriquecidos em uma única rede, com similaridade calculada entre os termos. Um corte de similaridade foi aplicado para criar arestas entre termos correlatos, estruturando a rede em módulos. Três módulos principais, localizados no centro da rede, estão associados às vias de sinalização EGFR, FGFR e a vias de câncer. Dentro do módulo de câncer, observa-se o termo “*Breast Cancer*” sugerindo que os miRNAs diferencialmente regulados na análise podem modular mecanismos moleculares associados ao câncer de mama. B) Distribuição dos 20 termos com menor p-valor, destacando vias relacionadas ao câncer, transdução de sinal, regulação da transcrição e funções do sistema imune.

Com objetivo de verificarmos como o exercício físico pode afetar o câncer de mama via sistema imune, buscamos os genes associados às vias de “*Cytokine Signaling in Immune System*” e “*Breast Cancer*” para cruzar com a rede miRNA-alvos (**Figura 11**). Nesse grafo é possível observar que os genes associados ao câncer de mama e a sinalização por citocinas, apresentam alta dispersão ao longo da rede, estando presente em todos os módulos identificados na **Figura 10a**. Esse resultado revela o caráter complexo e diversificado de modulação do sistema imune e do câncer pelos miRNAs, uma vez que essas moléculas têm ação sobre diversos miRNAs diretamente associados à manutenção desses processos biológicos. Sendo assim, para aprofundarmos nos

potenciais efeitos dos miRNAs no processo inflamatório e no câncer de mama, é necessário realizar análise de grafos de forma específica e direcionadas para esses processos.

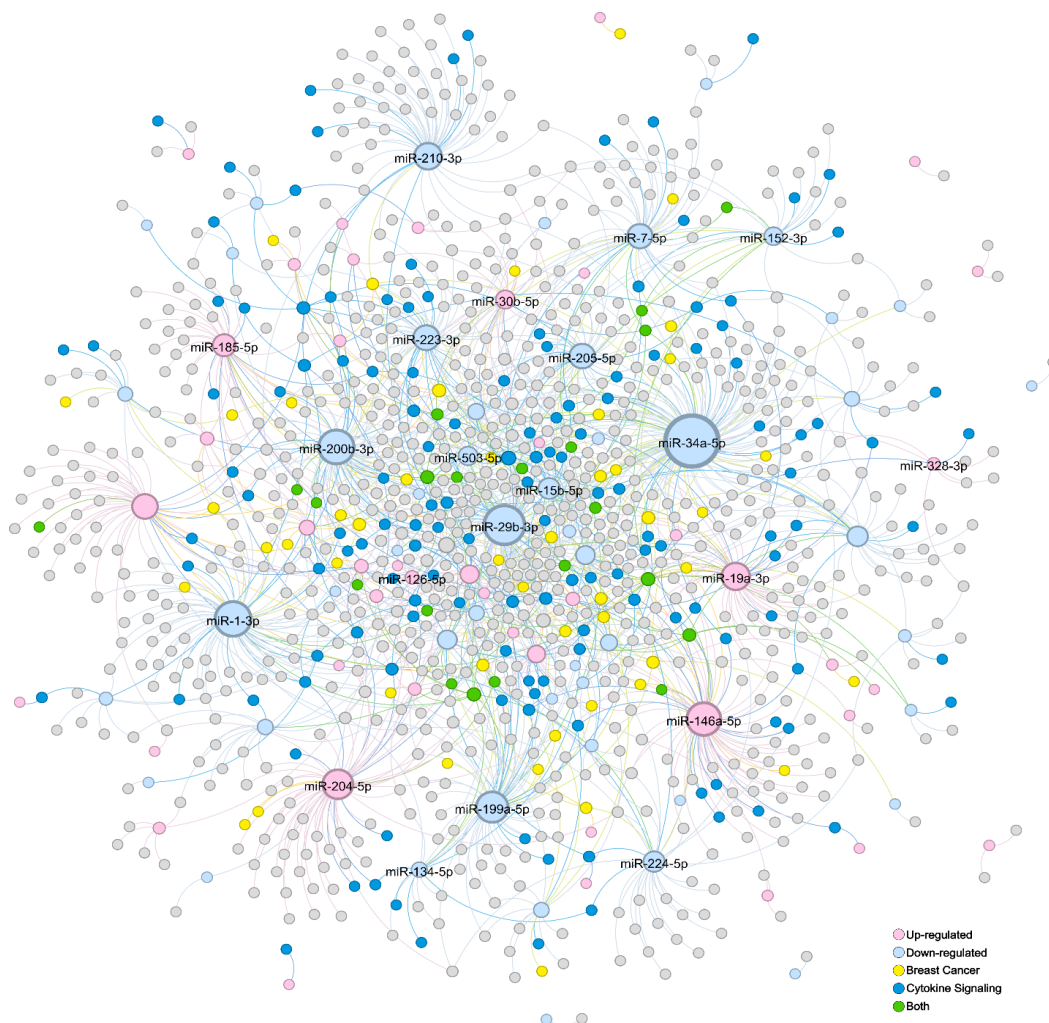


FIGURA 11. Interação entre genes associados ao câncer de mama e à sinalização de citocinas no sistema imune, cruzados com a rede miRNA-alvos. O grafo ilustra a distribuição dos genes de "Cytokine Signaling in Immune System" e "Breast Cancer" ao longo dos módulos identificados previamente na rede de enriquecimento (Figura 10a).

4.5. Efeitos de uma sessão de TC na expressão de miRNAs associados à inflamação

Para aprofundar a análise, filtramos a rede de interações considerando apenas os miRNAs associados às vias de sinalização relacionadas ao câncer de mama. A Figura 12 apresenta os miRNAs diferencialmente expressos que modulam genes envolvidos nessas vias: 14 miRNAs *up*-regulados, incluindo miR-19a-3p, miR-146a-5p, e miR-204-5p, que demonstram potencial em

estimular respostas antitumorais; e 27 miRNAs *down*-regulados, como miR-34a-5p, miR-152-3p, miR-224-5p, miR-29b-3p, miR-1-3p e miR-200b-3p, que podem estar relacionados à regulação negativa de genes que facilitam a progressão tumoral. Esse enfoque nos permite explorar como a modulação de miRNAs específicos pode impactar vias de sinalização chave no câncer de mama, indicando alvos potenciais para intervenções terapêuticas ou para uma maior compreensão dos mecanismos de ação do exercício físico nesse contexto.

Observamos interações com genes importantes e amplamente estudados, principalmente no contexto da inflamação. Entre os miRNAs *up*-regulados, destacam-se o miR-19a-3p, que regula o fator de necrose tumoral (TNF); o miR-146a-5p, associado aos genes BRCA1 e BRCA2, reconhecidos por seu papel crítico na resposta ao dano no DNA; e o miR-204-5p, que modula o gene BIRC2, uma proteína envolvida na via inflamatória do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Entre os miRNAs *down*-regulados, os miR-152-3p e miR-224-5p são notáveis por regularem o gene KRAS, enquanto o miR-224-5p e o miR-29b-3p também modulam o gene GSK3B, envolvido em processos inflamatórios e na sobrevivência celular.

Esses dados reforçam que diferentes miRNAs, tanto *up*-regulados quanto *down*-regulados, estão conectados a importantes vias da biologia do câncer de mama, incluindo vias inflamatórias canônicas. Esses miRNAs podem ter papéis antagônicos, promovendo tanto a supressão quanto a progressão tumoral, sugerindo um efeito complexo e potencialmente terapêutico na modulação dessas vias pelo exercício físico.

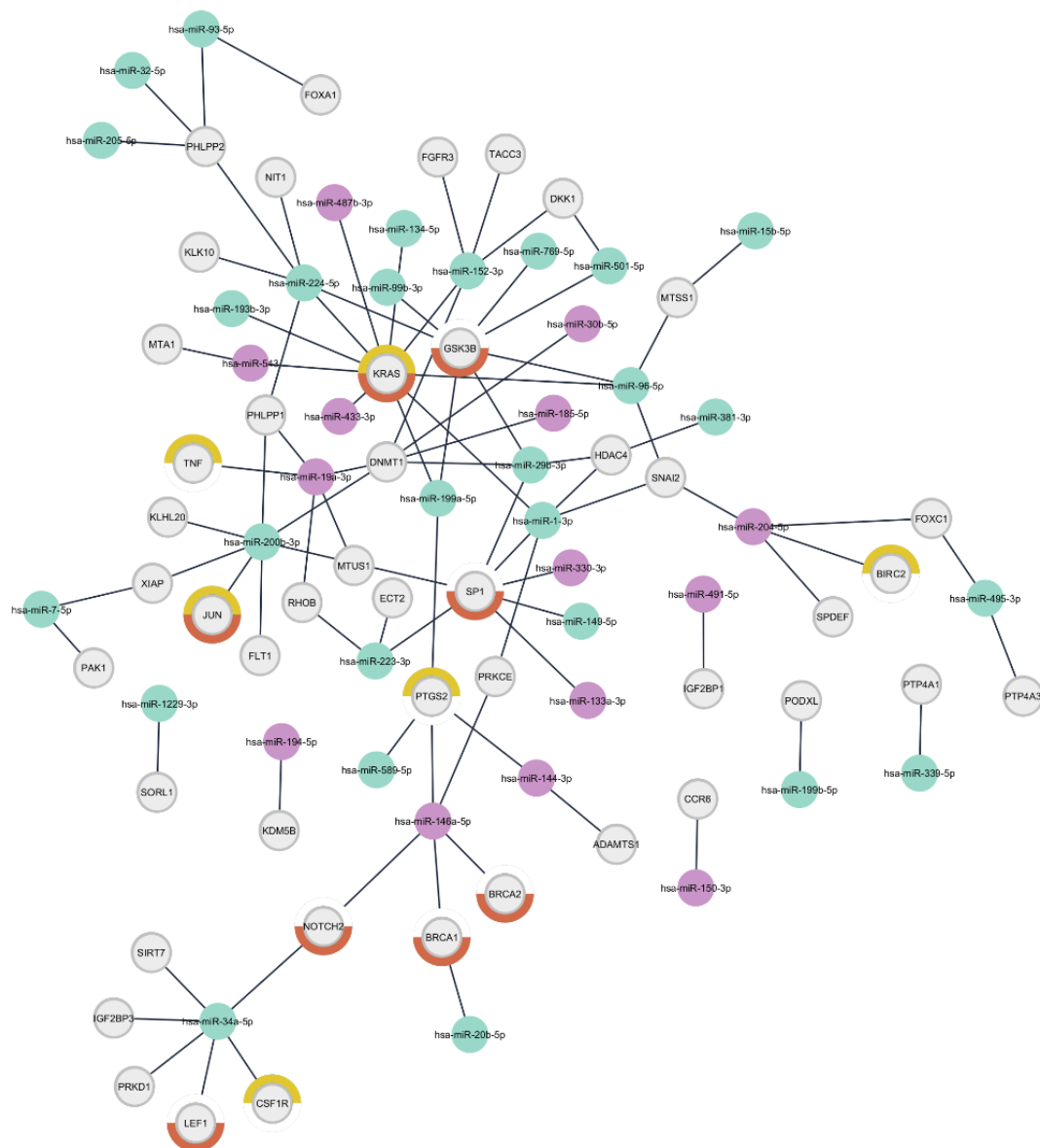


FIGURA 12. miRNAs *up-regulated* (em vermelho) e *down-regulated* (em azul) e suas interações com genes associados especificamente ao câncer de mama. Os genes com contorno em amarelo indicam que têm associação com sinalização de citocinas e sistema imune (*Reactome pathways*), enquanto os genes com contorno vermelho têm associação com o câncer de mama (*KEGG pathways*).

Para aprofundar ainda mais o papel dos miRNAs na regulação inflamatória, refinamos a análise de enriquecimento para destacar miRNAs ligados a citocinas inflamatórias (**Figura 13**). Este filtro revelou 11 miRNAs *up-regulados*, incluindo miR-19a-3p, miR-146a-5p, e miR-204-5p. Notavelmente, a maioria desses miRNAs também foi identificada anteriormente em vias

associadas ao câncer de mama, sugerindo uma sobreposição funcional entre esses processos. Por exemplo, o miR-19a-3p, anteriormente associado ao TNF na rede do câncer de mama, aparece na rede de citocinas associado à IL-10, uma interleucina-chave no processo anti-inflamatório, que também se mostrou ligado ao miR-194-5p. Além disso, o miR-204-5p mostrou estar associado à IL-11, uma importante interleucina da família da IL-6. Um dos miRNAs *up-regulated* com mais interações nessa rede foi o miR-146a-5p, que dentre outros alvos, se mostrou associado à IL-6, STAT-1 (Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição 1) e aos *clusters* de diferenciação CD80 e CD40.

Entre os 23 miRNAs *down-regulated*, alguns miRNAs destacam-se pelo papel em redes inflamatórias: o miR-34a-5p, indiretamente associado à IL-32, e os miR-1-3p e miR-379-5p com ligação direta à IL-11. Além disso, nossa análise mostrou a regulação no gene PIK3CD, via miR-199a-5p, e nas citocinas IL-6 e IL-10, pela ação do let-7c-5p. Outros como o miR-205-5p está associado à duas diferentes proteínas, a IL-32 e a quinase SRC, que está intimamente ligada às vias relacionadas ao EGFR e FGFR. O miR-7-5p também mostrou importantes associações: com as isoformas da proteína PIK3, PIK3CD, PIK3CG e com a proteína RELA, uma subunidade do NF- κ B. Esses achados destacam a capacidade dos miRNAs de interagir com múltiplas redes inflamatórias, indicando seu potencial papel na modulação dos processos inflamatórios associados ao câncer de mama.

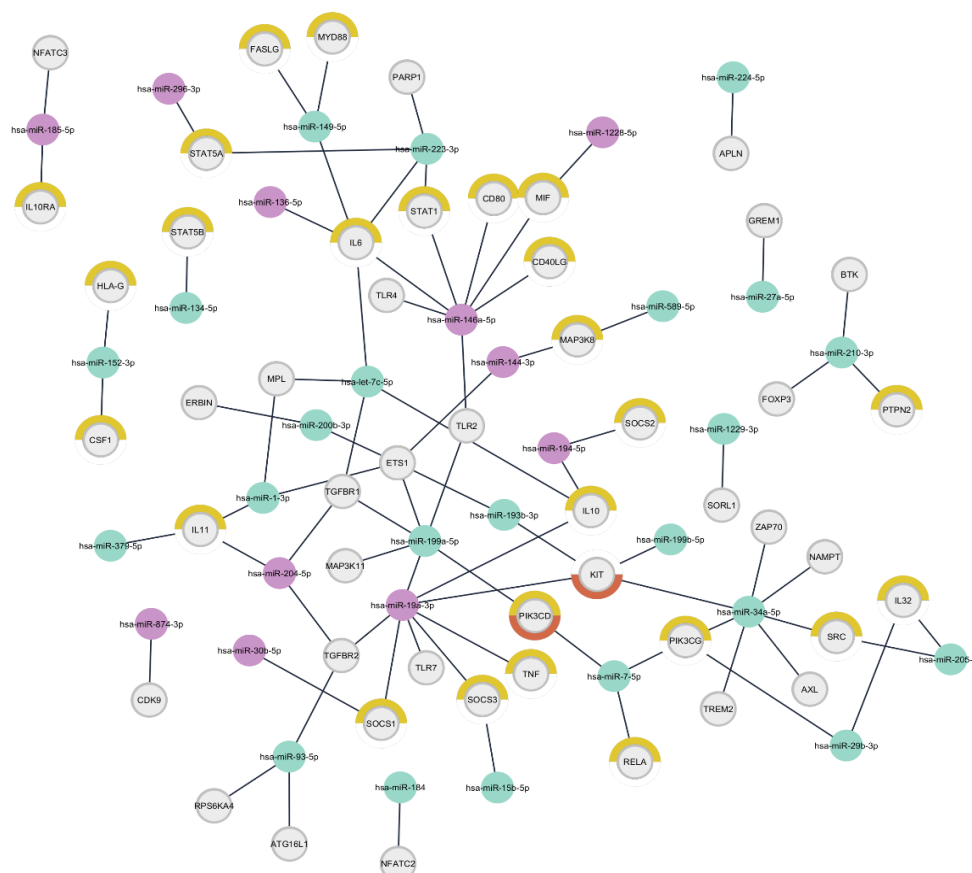


FIGURA 13. miRNAs *up-regulated* (em vermelho) e *down-regulated* (em azul) e suas interações com genes associados especificamente a citocinas. Os genes com contorno em amarelo indicam que têm associação com sinalização de citocinas e sistema imune (*Reactome pathways*), enquanto os genes com contorno vermelho têm associação com o câncer de mama (*KEGG pathways*).

Com base em uma publicação do nosso grupo aceita recentemente (BUZAGLO et al., 2024, *aceito para publicação*), vimos que as quimiocinas – subfamília de citocinas - se destacam por seu papel essencial na regulação do sistema imune, inflamação e desenvolvimento tumoral, exercendo funções que podem ser pró- ou antitumorígenicas. Com base nisso, analisamos a interação de miRNAs com quimiocinas (**Figura 14**) e identificamos sete miRNAs *up-regulated*. Entre eles, o miR-146a-5p se destacou ao modular a quimiocina CCL5 e o receptor de quimiocina CXCR4; este último também é regulado pelo miR-204-5p, outro miRNA *up-regulated*.

Entre os 12 miRNAs *down-regulated*, observamos interações significativas com quimiocinas: o miR-223-3p, associado à CXCL2 e à CCL3, o miR-1-3p interage com a CCL2 e

CXCL12, e o miR-34a-5p regula a CCL22. Esses achados reforçam a complexidade das interações dos miRNAs com quimiocinas, sugerindo um papel multifacetado desses reguladores na modulação do microambiente inflamatório e tumoral.

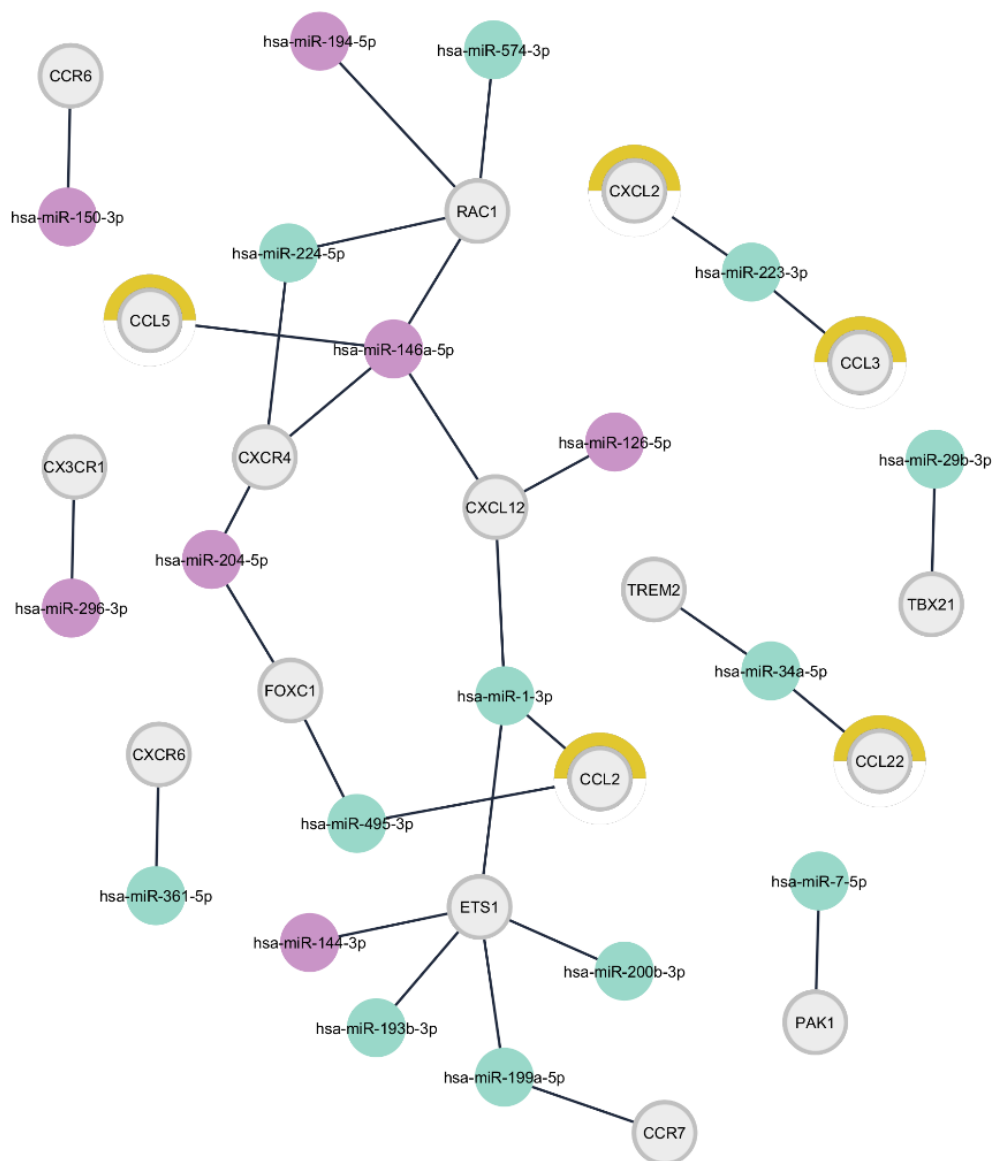


FIGURA 14. miRNAs *up-regulated* (em vermelho) e *down-regulated* (em azul) e suas interações com genes associados especificamente a quimiocinas. Os genes com contorno em amarelo indicam que têm associação com sinalização de citocinas e sistema imune (*Reactome pathways*).

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo examinar os efeitos de uma sessão de treinamento combinado (TC) na expressão de miRNAs incorporados em vesículas extracelulares (VEs) ligadas à inflamação em mulheres com câncer de mama. Primeiramente, demonstramos que uma sessão de TC não resultou em mudanças significativas na concentração de partículas positivas para os principais marcadores de VEs (CD9, CD63 e CD81), medida diretamente no plasma das pacientes, sugerindo que as alterações induzidas pelo exercício ocorrem nas moléculas associadas a essas VEs, e não na quantidade de partículas. Em seguida, mostramos que o TC pode induzir mudanças na expressão de miRNAs associados às VEs de forma aguda. Por fim, mostramos pela primeira vez que há um aumento na quantidade de miRNAs que regulam a inflamação sistêmica. Esses resultados sugerem que os potenciais efeitos reguladores e adaptativos do exercício físico sobre a progressão tumoral podem, de fato, ser mediados por miRNAs associados às VEs.

Estudos anteriores sugerem que os efeitos antitumorais diretos do exercício físico no câncer de mama são amplamente decorrentes da produção sistêmica de exercinas, liberadas de forma aguda durante ou logo após as sessões de exercício (DETHLEFSEN et al., 2016; DETHLEFSEN; PEDERSEN; HOJMAN, 2017; HOJMAN et al., 2018). Entre essas exercinas, as VEs vêm recebendo atenção especial, dado seu papel na mediação da comunicação intercelular induzida pelo exercício, incluindo o transporte de miRNAs. A literatura sugere que essas VEs liberadas transitoriamente após o exercício físico podem regular diretamente a progressão do tumor, facilitando a comunicação celular por meio de miRNAs específicos (CHOW et al., 2022; SADOVSKA et al., 2022; SIQUEIRA et al., 2023).

Considerando o potencial antitumoral das VEs induzidas pelo exercício, este estudo examinou se uma sessão de TC poderia alterar os níveis de VEs em pacientes com câncer de mama. Considerando a análise por rastreamento de nanopartículas (NTA), encontramos um aumento na concentração de VEs circulantes logo após uma sessão de TC. Este achado está de acordo com estudos anteriores (FRÜHBEIS et al., 2015; WHITHAM et al., 2018), que também relataram elevações na concentração de VEs após o exercício em indivíduos saudáveis, detectadas via NTA. Frühbeis et al. (2015) observaram um aumento na concentração de pequenas VEs imediatamente após o exercício aeróbico em homens saudáveis, com uma redução gradual aos níveis basais após 90 minutos de repouso (FRÜHBEIS et al., 2015). De maneira semelhante, Whitham et al. (2018)

reportaram aumentos na concentração de VEs em homens jovens após exercícios aeróbicos (WHITHAM et al., 2018). Em conjunto, esses resultados sugerem que uma única sessão de TC pode aumentar os níveis sistêmicos de pequenas VEs em pacientes com câncer de mama em estado destreinado.

A análise por NTA mede a concentração geral de partículas, sem distinguir especificamente as VEs. No entanto, as frações obtidas por SEC são consideradas altamente enriquecidas em VEs, sugerindo que a resposta observada seja predominantemente atribuída a essas vesículas. Estudos recentes apontam para uma liberação transitória de VEs na circulação em resposta ao estresse causado por exercícios agudos em indivíduos saudáveis (FRÜHBEIS et al., 2015). Além disso, análises proteômicas realizadas em VEs isoladas de plasma livre de plaquetas após exercícios demonstraram um aumento significativo em várias classes de proteínas típicas de VEs (WHITHAM et al., 2018). Esses achados são consistentes com os resultados de análises por NTA, que também indicaram um aumento quantitativo de nanopartículas após o exercício, alinhando-se aos nossos resultados (FRÜHBEIS et al., 2015; WHITHAM et al., 2018). Contudo, a interpretação desses achados com base na NTA pode ser limitada por possíveis contaminações com partículas de lipoproteínas, que possuem características semelhantes às VEs e podem ser contadas como partículas pelo *NanoSight* (BRAHMER et al., 2020; GARDINER et al., 2016).

Nossos testes de Western Blotting confirmaram a presença de lipoproteínas nas amostras analisadas, sugerindo que parte das partículas contadas pelo NTA possa incluir lipoproteínas. Esse achado sublinha a necessidade de métodos complementares para uma quantificação mais precisa de VEs no plasma após o exercício. Esses resultados confirmam a presença de VEs nas frações 1-4 isoladas por SEC, mas também revelam a presença de outras partículas, como lipoproteínas, o que pode introduzir viés na contagem de partículas pelas análises NTA em amostras purificadas por SEC. Além disso, o método escolhido para isolamento e caracterização de VEs pode influenciar consideravelmente os resultados. Diversos métodos de isolamento (como precipitação com polímeros, ultrafiltração, centrifugação diferencial e SEC) são empregados na literatura, ressaltando a ausência de um método padrão universal para purificação de VEs. Adicionalmente, nenhum desses métodos oferece 100% de eficiência na purificação de VEs a partir do plasma, o que pode gerar vieses na interpretação dos dados sobre a resposta de VEs ao exercício.

Para mitigar essa limitação, utilizamos a tecnologia de sensoriamento por imagem interferométrica de partículas individuais (SP-IRS), conforme descrito por McIlvenna et al. (2023), permitindo a quantificação direta das VEs nas amostras de plasma sem a necessidade de purificação prévia (MCILVENNA et al., 2023). Ao utilizar o SP-IRS em amostras de plasma de pacientes com câncer de mama, não observamos mudanças significativas nas concentrações de partículas positivas para os marcadores CD9, CD63 e CD81 após a sessão de TC. Esses resultados contrastam com nossos achados obtidos pelo NTA, sugerindo que o aumento observado no NTA possa, de fato, ser decorrente de lipoproteínas em vez de VEs. Além disso, nossos dados diferem dos resultados de McIlvenna et al. (2023), que demonstraram aumento nas VEs CD9+, CD63+ e CD81+ após uma sessão de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), tanto em plasma pobre em plaquetas quanto em plasma livre de plaquetas (MCILVENNA et al., 2023). Em contraste, nosso estudo utilizou um protocolo de TC, incluindo apenas um exercício final de HIIT em formato longo. Esse protocolo difere do HIIT de sprints utilizado por McIlvenna et al. (2023), que envolveu estímulos mais curtos e de maior intensidade (4 x 30s a 200% da potência aeróbica máxima), o que pode ter contribuído para a discrepância nos resultados, dada a diferença nas demandas metabólicas (BUCHHEIT; LAURSEN, 2013a, 2013b). Além do protocolo de exercício, fatores como o sexo (homens vs. mulheres), estado de saúde (indivíduos saudáveis vs. pacientes com câncer) e composição corporal (eutróficos vs. obesos) podem influenciar a resposta de liberação de VEs e, também, explicar as diferenças observadas (NEDERVEEN et al., 2021; RIGAMONTI et al., 2020). Mesmo que uma sessão de TC não eleve significativamente a concentração de VEs no plasma, o aumento do fluxo sanguíneo sistêmico durante o exercício potencialmente eleva a biodisponibilidade dessas partículas para diferentes tecidos, incluindo o tumor em pacientes com câncer de mama. Adicionalmente, alterações induzidas pelo exercício no conteúdo molecular das VEs podem ser suficientes para induzir adaptações teciduais relevantes, mesmo na ausência de um aumento expressivo na concentração de VEs no plasma.

De fato, nossos resultados indicam que o potencial efeito antitumoral do TC está fortemente associado a mudanças no conteúdo molecular das VEs, com destaque para a expressão de miRNAs, que foi o principal foco de nossa análise. Considerando o papel regulador dos miRNAs em vias associadas ao desenvolvimento tumoral, testamos se uma sessão de TC poderia modificar a expressão desses miRNAs em VEs circulantes. Pela primeira vez, demonstramos que uma sessão única de TC altera a expressão de miRNAs em VEs no plasma de pacientes com câncer de mama

antes do início de qualquer tratamento oncológico. O sequenciamento de RNAs pequenos revelou um extenso conjunto de miRNAs com níveis de expressão aumentados ou diminuídos após a sessão de TC em relação ao pré-exercício. Além disso, foram identificados miRNAs que surgiram exclusivamente no momento pós-exercício, sugerindo um perfil de expressão distinto induzido pelo exercício físico. Os dados evidenciam uma modulação significativa na expressão dos miRNAs associados às VEs, com variações expressivas tanto em miRNAs relacionados à supressão tumoral (TSmiRs) quanto em miRNAs associados à progressão tumoral (oncomiRs).

Uma das grandes limitações do nosso estudo foi a impossibilidade de comparações estatísticas pelo uso de amostras em *pool* para cada momento experimental, proporcionando apenas uma visão geral das possíveis mudanças nos miRNAs associados às VEs em resposta ao TC. Ao realizar *pools* das amostras, não realizamos a análise formal de expressão diferencial entre grupos, focando em calcular o *fold-change* (FC) e o \log_2FC entre os momentos pré e pós-exercício como medida preliminar das variações de expressão. Foram identificados 330 miRNAs no total, dos quais 212 estavam presentes em ambos os momentos, sugerindo uma expressão consistente dos miRNAs em diferentes momentos. Adicionalmente, foram observados 88 miRNAs exclusivos para um dos momentos, com 36 específicos do pré-exercício e 52 do pós-exercício, o que pode indicar perfis de expressão característicos do estado de repouso ou da resposta aguda ao exercício.

Considerando como diferencialmente expressos os miRNAs com valores de $-1,5 < \log_2FC < 1,5$, os que mostraram maior regulação positiva (*up-regulated*, com os maiores valores de $\log_2 fold-change$ positivo) foram miR-543, miR-126-5p, miR-1228-5p, miR-664a-5p e let-7b-3p. A análise desses miRNAs específicos revela papéis variados e complexos no câncer de mama, onde alguns agem como supressores tumorais (TSmiRs) e outros promovem o crescimento tumoral (oncomiRs). Por exemplo, o miR-543 atua principalmente como TSmiR, contribuindo para a supressão de vias críticas de proliferação celular e diminuindo a invasão das células tumorais. Sua capacidade de regular genes oncogênicos, como o PVT1, reforça seu papel na restrição da progressão tumoral em células de câncer de mama (LU et al., 2021). Já o miR-126 também é considerado um TSmiR, uma vez que regula negativamente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), reduzindo a angiogênese e a proliferação celular no contexto tumoral. Níveis baixos de miR-126 foram associados a um aumento na agressividade da doença, sublinhando sua importância no controle da progressão do câncer de mama (SHINDE et al., 2023). Por outro lado, o miR-1228 geralmente exibe características de oncomiR, pois sua superexpressão promove a

resistência à apoptose e a sobrevivência celular, contribuindo para o avanço do câncer de mama e de outros tipos de câncer. No entanto, apesar das evidências, é necessário interpretar os dados com cautela, pois é fundamental esclarecer completamente seu papel específico no câncer de mama (LU et al., 2021). O miR-664 é interessante por sua ambiguidade funcional, já que pode promover a invasão e proliferação celular em certos contextos, mas também demonstrou capacidades de inibir a migração celular dependendo do ambiente tumoral, evidenciando uma função dual que ainda precisa ser detalhadamente investigada (SHINDE et al., 2023). Finalmente, a família let-7, conhecida pelo seu papel robusto como TSmiR, regula genes oncogênicos como MYC e RAS, que são fundamentais para a divisão e sobrevivência celular.

No câncer de mama, a baixa expressão do let-7 está frequentemente associada a tumores mais agressivos e de pior prognóstico, mostrando que sua atividade é essencial para a supressão tumoral em vários estágios da progressão do câncer (SHINDE et al., 2023). Ademais, evidências anteriores demonstraram que o treinamento físico induz um aumento na expressão de membros da família let-7 em modelos de câncer de mama (ISANEJAD et al., 2016), corroborando com os achados do presente estudo. Dessa forma, esses miRNAs, particularmente os da família let-7, representam alvos potenciais importantes para intervenções terapêuticas e oferecem perspectivas diferenciadas sobre o papel regulatório dos miRNAs na biologia do câncer de mama.

Em contrapartida, quando analisamos os miRNAs mais regulados negativamente (*down-regulated*), os de maior destaque foram miR-381-3p, miR-505-5p, miR-148a-5p, miR-379-5p e miR-3175, e todos eles são considerados TSmiRs. O miR-381 é reportado como um importante supressor tumoral no câncer de mama, especialmente no tipo triplo-negativo (ZENG et al., 2020). Esse miRNA inibe a via PI3K/AKT/mTOR, reduzindo a proliferação celular e limitando a invasão de células tumorais. A modulação negativa do IGF-1R e de outras proteínas relacionadas à metástase, como NAMPT e ETS1, reforça seu potencial na contenção da progressão tumoral, sendo um alvo promissor em estratégias anticâncer (MIRICESCU et al., 2021). Como temos na amostra apenas uma paciente com tumor triplo negativo, é plausível sugerir que, de fato o exercício físico pode modular apenas uma paciente com tumor triplo negativo, os resultados miR-381 também em outros tipos de tumor de mama. De maneira geral, os resultados sugerem padrões diferenciais de expressão de miRNAs relacionados ao exercício físico, indicando potenciais candidatos que podem desempenhar papéis importantes nas respostas ao exercício ou na biologia do câncer.

Para entender os mecanismos bioquímicos e funcionais associados a esses miRNAs, analisamos genes diferencialmente expressos em relação aos dados disponíveis no *miRTarBase*. Esse banco de dados é amplamente utilizado na pesquisa de miRNAs, pois registra miRNAs e seus mRNAs-alvo com interações comprovadas experimentalmente. Com base nessa análise, construímos uma rede de interação miRNA-alvo que abrange 1.596 interações entre os miRNAs diferencialmente regulados e seus respectivos mRNAs. Para reduzir a complexidade dessa rede, aplicamos uma análise de modularidade e selecionamos módulos contendo ao menos dois miRNAs, identificando 21 regiões de alta densidade de conexões — as chamadas comunidades de interação dos miRNAs. Em cada um dos 21 módulos identificados, nomeamos a comunidade com base no miRNA com maior grau (ou seja, o número de conexões) dentro do respectivo módulo. Em seguida, realizamos uma análise quantitativa para caracterizar cada módulo, extraindo métricas como o miRNA de maior grau em cada módulo, o número de nós (genes-alvo e miRNAs), o grau médio dos miRNAs e o número total de miRNAs por módulo. Essas análises revelaram uma diversidade substancial entre as comunidades, destacando-se alguns módulos com características únicas.

Especificamente, o miR-34a-5p apresentou o maior grau na rede, com 132 conexões, sugerindo um papel central em potenciais vias de regulação em câncer, corroborado pela literatura (HERMEKING, 2010; JANSSON; LUND, 2012). Este miRNA é amplamente conhecido por suas propriedades antitumorais. Ele regula genes como MYC e BCL2, promovendo a apoptose e limitando a proliferação celular. Sua *down*-regulação tem sido associada ao aumento da progressão tumoral e da resistência à apoptose (HERMEKING, 2010). Assim, sua redução pode sinalizar uma perda de controle sobre mecanismos reguladores importantes, o que favorece a sobrevivência das células tumorais. Por outro lado, o módulo do miR-1-3p destacou-se pelo maior número de nós, sugerindo uma ampla gama de alvos regulatórios (HAN et al., 2014). Além disso, cinco comunidades mostraram o número máximo de miRNAs por módulo (seis), sendo que o miR-146a-5p, conhecido por seu papel na inflamação e no câncer (TAGANOV et al., 2006), apresentou o maior número de conexões entre todas essas comunidades. Um achado curioso foi o módulo do miR-19a-3p, que exibiu um grau médio por miRNA superior ao grau máximo de outras comunidades, o que pode estar relacionado ao alto número de nós associado a esse miRNA e sua potencial relevância na rede de interação em câncer de mama (OLIVE; JIANG; HE, 2010). A presença de miRNAs com altos níveis de conexão ou localizados em módulos de alta densidade

sugere uma provável associação desses miRNAs com processos biológicos relevantes para a progressão do câncer de mama.

Da mesma forma, os miRNAs miR-152-3p e miR-224-5p regulam o oncogene KRAS, um componente essencial de várias vias de sinalização relacionadas à proliferação celular, incluindo a via MAPK/ERK. A down-regulação desses miRNAs permite maior ativação de KRAS, potencializando a progressão tumoral (WANG; LUO, 2015). Além disso, o miR-224-5p também está envolvido na regulação do gene GSK3B, um modulador da sobrevivência celular e da inflamação tumoral. Sua redução pode criar um ambiente mais permissivo ao crescimento tumoral. Outro miRNA notável é o miR-29b-3p, conhecido por seu papel na regulação da metilação do DNA e na promoção de apoptose em células tumorais. A *down*-regulação deste miRNA está associada ao aumento da invasão e da sobrevivência tumoral em câncer de mama (YAN et al., 2015). No mesmo contexto, o miR-1-3p, que regula genes envolvidos na proliferação celular, como FOXO3, também apresenta redução, o que pode favorecer o crescimento tumoral (HUDSON et al., 2012). Por fim, o miR-200b-3p, um regulador da transição epitélio-mesenquimal (EMT), apresenta down-regulação, sugerindo maior potencial para invasão e metástase tumoral (MONGROO; RUSTGI, 2010). Esses achados apontam para um possível papel do TC na regulação de miRNAs que podem influenciar processos tumorais via modulação das VEs, refletindo uma resposta molecular que pode ser relevante para o controle da progressão tumoral em pacientes com câncer de mama.

Para investigar o potencial dos miRNAs em modular vias biológicas por meio da regulação de mRNAs-alvo, conduzimos uma análise de enriquecimento com base nos bancos de dados KEGG e Reactome, que são amplamente utilizados para compreender as vias de sinalização celular e suas relações com a progressão tumoral e a resposta imunológica. A análise revelou 912 vias moduladas pelos mRNAs-alvo, e, conseqüentemente, suscetíveis à modulação pelos miRNAs diferencialmente regulados em nosso estudo. Essa ampla identificação de vias potenciais sublinha a complexidade do papel dos miRNAs na regulação molecular de processos envolvidos no câncer. Dado o volume de dados, utilizamos uma abordagem de mapa de enriquecimento para condensar e estruturar as informações em uma única rede de termos enriquecidos. A análise de redes permite estabelecer conexões entre vias relevantes, com destaque para as que exibiram os menores p-valor, indicando significância estatística elevada. Esse tipo de análise pode fornecer insights mais profundos sobre a organização estrutural e funcional das vias moduladas. Trabalhos recentes têm

demonstrado a eficácia da análise de redes para simplificar a interpretação de grandes conjuntos de dados em biologia de sistemas, sendo um método particularmente útil para estudar a interação entre miRNAs e processos celulares complexos (SZKLARCZYK et al., 2023; YU; WANG; HE, 2015).

Dentro dessa rede, destacaram-se três módulos principais associados à sinalização mediada por EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), FGFR (receptor do fator de crescimento de fibroblastos) e ao câncer, incluindo especificamente o câncer de mama. Esses resultados estão em linha com estudos que identificam a sinalização EGFR e FGFR como vias críticas na progressão do câncer de mama e outras neoplasias (TURNER; GROSE, 2010; WIEDUWILT; MOASSER, 2008), sugerindo que os miRNAs regulados em nosso estudo possam exercer efeitos relevantes nessas vias. Além disso, os termos de menor p-valor incluíram vias ligadas à transdução de sinal, à transcrição gênica e ao sistema imune, sugerindo que os miRNAs estudados podem influenciar processos biológicos amplamente relacionados ao crescimento e à imuno modulação tumoral. Trabalhos anteriores destacam a importância da sinalização de citocinas e da resposta imune em cânceres, com miRNAs desempenhando papel fundamental na regulação da resposta inflamatória (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; RAISCH; DARFEUILLE-MICHAUD; NGUYEN, 2013).

Para explorar como o exercício físico pode influenciar a resposta imune no contexto do câncer de mama, examinamos especificamente os genes associados às vias "*Cytokine Signaling in Immune System*" e "*Breast Cancer*". A distribuição ampla desses genes na rede sugere que a modulação exercida pelos miRNAs é altamente complexa e difusa, atuando em diversos módulos da rede, o que reforça a importância de uma análise segmentada para entender como os miRNAs interagem com vias específicas de inflamação e oncogênese (AOI; SAKUMA, 2014; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). Por fim, a necessidade de uma análise de grafos focada nos efeitos de miRNAs sobre o câncer e o sistema imune é evidente, dado o papel multifacetado que essas moléculas desempenham na biologia tumoral. Estudos futuros devem aprofundar essas interações em contextos específicos, como câncer de mama e inflamação, com o intuito de elucidar mecanismos que possam ser explorados em intervenções terapêuticas e de exercício físico.

Entre os miRNAs *up*-regulados, o miR-19a-3p, parte do *cluster* do miR-17-92, está associado à regulação de processos inflamatórios e de proliferação celular. Em particular, ele regula o fator de necrose tumoral (TNF), um mediador inflamatório crucial no microambiente tumoral. Embora

o TNF possa promover a inflamação tumoral em certos contextos, a regulação exercida pelo miR-19a-3p pode também induzir apoptose celular e limitar o crescimento tumoral, especialmente em situações de estresse celular, como as induzidas pelo exercício físico (CHAKRABORTY et al., 2020). Isso sugere que o miR-19a-3p pode atuar como um mediador adaptativo com efeitos potencialmente antitumorais.

Outro miRNA *up*-regulado de destaque é o miR-146a-5p, amplamente reconhecido por seu papel na modulação da inflamação e na resposta ao dano no DNA. Este miRNA interage com genes como BRCA1 e BRCA2, fundamentais para a estabilidade genômica. Estudos sugerem que a regulação desses genes pelo miR-146a-5p pode reduzir a instabilidade genômica, uma característica importante no desenvolvimento tumoral do câncer de mama. Além disso, o miR-146a-5p é conhecido por inibir a ativação descontrolada do fator nuclear kappa B (NF-κB), um regulador inflamatório frequentemente hiperativado em tumores, contribuindo assim para um ambiente tumoral menos permissivo (HAN et al., 2023; LIU et al., 2017). A evidência de que o exercício físico pode aumentar a expressão desse miRNA corrobora o papel do treinamento físico como modulador de vias antitumorais (TELLES et al., 2022).

O miR-204-5p também foi identificado como *up*-regulado neste estudo. Este miRNA está envolvido na regulação do gene BIRC2, uma proteína que desempenha um papel crítico na ativação da via do NF-κB. A redução da ativação dessa via, promovida pela *up*-regulação do miR-204-5p, pode resultar em maior apoptose celular e menor sobrevivência de células tumorais (WA et al., 2019). O miR-204-5p regula negativamente genes que participam da via PI3K/AKT/mTOR, como receptores de fatores de crescimento, PI3K e AKT, promovendo a inibição dessa via, que é crucial para a sobrevivência celular. A redução da atividade dessa via leva à diminuição da fosforilação de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, e ao aumento da atividade de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial e na liberação de citocromo c. Isso ativa a cascata de caspases, promovendo a fragmentação do DNA e a morte celular programada. Consequentemente, o aumento do miR-204-5p reduz a sobrevivência e proliferação de células tumorais, favorecendo a apoptose e limitando o crescimento do tumor (HONG et al., 2019). Este mecanismo antitumoral reforça a relevância do miR-204-5p como alvo potencial em estratégias terapêuticas que incluem intervenções baseadas em exercício físico.

A relação entre exercício físico e miRNAs circulantes é bem documentada na literatura, com evidências de que o exercício pode modular a expressão de miRNAs com efeitos antitumorais. Por exemplo, o treinamento aeróbico está associado à *up*-regulação do miR-146a-5p, outro miRNA que se destacou em nossas análises, contribuindo para a redução da inflamação e para a melhora do reparo de DNA (AFZAL et al., 2024). De maneira semelhante, estudos apontam que o exercício físico pode impactar a expressão de miRNAs, como o miR-146a-5p, conhecido por modular a inflamação por meio da regulação de IRAK1 e TRAF6, inibindo a via do NF- κ B (RUSSO et al., 2018). Embora a relação direta com o exercício ainda careça de estudos mais robustos, o papel desse miRNA em respostas antitumorais e inflamatórias é amplamente reconhecido (LIAO; ZHENG; SHAO, 2023). Essas interações demonstram o potencial do exercício físico como uma intervenção coadjuvante no tratamento do câncer de mama, com impactos diretos na modulação epigenética.

Nossos resultados indicam um papel crucial dos miRNAs na modulação da resposta inflamatória, com potenciais implicações para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama. A identificação de miRNAs *up*-regulados e *down*-regulados em associação com citocinas inflamatórias e vias de sinalização relacionadas sugere uma complexa rede de interações que pode influenciar o microambiente tumoral e a resposta do hospedeiro. O miR-19a-3p, miR-146a-5p e miR-204-5p aparecem como miRNAs *up*-regulados com potencial relevância na inflamação e no câncer de mama. O miR-19a-3p tem papel relevante na regulação da inflamação no contexto do câncer de mama, com interações ligadas a citocinas como TNF e IL-10. A associação com o TNF destaca seu envolvimento em vias pró-inflamatórias, enquanto sua relação com a IL-10 reflete potencial na modulação anti-inflamatória. Esse mecanismo sugere que o miR-19a-3p atua como um mediador dinâmico, equilibrando a inflamação de acordo com o microambiente tumoral. Estudos apontam que o miR-19a-3p regula a proliferação e a apoptose por influenciar vias moleculares dependentes do subtipo tumoral. Por exemplo, em câncer de mama triplo-negativo, promove proliferação e metástase ao regular genes associados ao TNF e à inflamação, como demonstrado por Wang et al. (2020) (WANG et al., 2020). Em contraste, no subtipo luminal A, pode estimular apoptose e inibir a proliferação, provavelmente pela interação com IL-10 e genes anti-inflamatórios, conforme revisado por Petri et al. (2020) (PETRI; KLINGE, 2020). Assim, é crucial investigar como o miR-19a-3p coordena essas respostas por meio de sua interação com

citocinas, contribuindo para o desenvolvimento ou supressão tumoral, dependendo do contexto molecular. Estudos futuros do nosso grupo, incluirão a análise de pacientes individuais.

O miR-146a-5p destaca-se como um regulador central da inflamação, associado à IL-6, STAT-1 e CD40. Estudo clássico de Taganov et al. (2006) demonstrou que o miR-146a-5p é induzido por lipopolissacarídeos (LPS) em monócitos humanos e atua como um regulador negativo da via NF- κ B, crucial na resposta inflamatória (TAGANOV et al., 2006). No câncer de mama, ele apresenta funções ambíguas, com evidências tanto de supressão tumoral quanto de promoção de metástase (ELSARRAJ et al., 2012; PANOUTSOPOULOU et al., 2023).

Entre os miRNAs *down*-regulados, miR-34a-5p, miR-1-3p, miR-379-5p, miR-199a-5p e let-7c-5p estão associados a diversas vias inflamatórias. O miR-34a-5p tem ligação indireta à IL-32, uma citocina pró-inflamatória, e estudos como o de Li et al. (2021) sugerem que ele inibe a expressão de IL-11 em células de câncer de pulmão, indicando um potencial papel anti-inflamatório (LI et al., 2021). Já o let-7c-5p é conhecido por modular genes como IL-6 e IL-10, inibindo respostas inflamatórias em modelos experimentais (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009).

Os dados deste estudo também apontam para miRNAs que interagem com vias inflamatórias pouco exploradas. Por exemplo, o miR-205-5p foi relacionado à IL-32 e à proteína quinase SRC, enquanto o miR-7-5p interage com isoformas de PIK3 e RELA, subunidade do NF- κ B. Embora faltem estudos diretos conectando o miR-205-5p à IL-32, Tsai et al. (2014) mostraram que a IL-32 promove proliferação e invasão em câncer gástrico via NF- κ B (TSAI et al., 2014). Da mesma forma, Fang et al. 2012 evidenciaram que o miR-7-5p inibe a via PI3K/AKT em células de câncer gástrico (FANG et al., 2012). Estes achados indicam que os efeitos desses miRNAs dependem do contexto tumoral e inflamatório.

Outro ponto relevante foi a análise da interação entre miRNAs e quimiocinas, destacando o miR-146a-5p como regulador de CCL5 e CXCR4. A CCL5 é uma quimiocina pró-inflamatória que atrai células imunes para locais de inflamação, enquanto o CXCR4 regula a migração tumoral. O impacto da regulação do miR-146a-5p sobre essas moléculas pode ser relevante na progressão do câncer de mama, mas faltam estudos conclusivos que explorem essa relação de forma direta.

Por outro lado, miRNAs como o miR-223-3p, miR-1-3p e miR-34a-5p foram associados a interações potenciais com quimiocinas, como CXCL2, CCL3 e CCL22, mas carecem de evidências mais robustas na literatura. Embora o miR-223-3p seja conhecido por regular a inflamação em

células imunes, sua influência em quimiocinas específicas ainda não está esclarecida. O mesmo ocorre com o miR-1-3p e o miR-34a-5p, cujas interações com quimiocinas relevantes no contexto do câncer de mama precisam ser exploradas mais profundamente.

Os resultados deste estudo reforçam o papel crucial dos miRNAs na regulação de quimiocinas e da inflamação, com potenciais implicações na progressão tumoral. Contudo, as lacunas na literatura evidenciam a necessidade de mais pesquisas para estabelecer ligações robustas entre miRNAs, citocinas e quimiocinas. Explorar essas interações pode revelar novos mecanismos moleculares e abrir caminho para estratégias terapêuticas mais eficazes no combate ao câncer de mama.

Os resultados apresentados sugerem um papel essencial dos miRNAs na regulação da inflamação no câncer de mama, destacando sua interação com citocinas e vias de sinalização inflamatórias. Contudo, os resultados devem ser interpretados com cautela devido às limitações metodológicas, como o uso de análises por pool de amostras em vez de avaliações individuais, o que pode mascarar variabilidades biológicas importantes. Além disso, o efeito de uma única sessão de exercício físico pode não ser suficiente para capturar mudanças consistentes nos miRNAs e suas interações com citocinas. Apesar disso, os pontos fortes do estudo incluem métodos robustos para caracterização das vesículas extracelulares e a adoção de um protocolo de treino voltado para a melhora da saúde geral em mulheres com câncer, alinhado a intervenções clínicas viáveis. Estudos futuros devem abordar essas limitações e explorar mais profundamente os mecanismos moleculares que conectam miRNAs, inflamação e progressão do câncer de mama, bem como unir e correlacionar com as variáveis clínicas das pacientes, visando elucidar o potencial terapêutico do exercício físico.

6. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo indicam que uma única sessão de treinamento combinado, realizada antes do início do tratamento oncológico, pode ter um papel importante na regulação de vias inflamatórias e de câncer de mama, por meio de modificações em miRNAs associados a vesículas extracelulares. Esses resultados destacam o potencial das intervenções de exercício físico como estratégia para melhorar a saúde das pacientes e possivelmente retardar a progressão do tumor em casos de câncer de mama. No entanto, há uma necessidade urgente de ensaios clínicos com amostras mais amplas e acompanhamento em longo prazo para aprofundar a compreensão sobre os efeitos do treinamento combinado e explorar seu valor terapêutico. Além disso, é importante considerar o efeito de múltiplas sessões de treinamento em pacientes com câncer de mama, dado que uma intervenção prolongada poderia resultar em modificações sustentáveis e cumulativas nos níveis de miRNAs, promovendo maior impacto antitumoral. Estudos futuros de prova de conceito devem se concentrar em identificar a ação antitumoral de miRNAs específicos no contexto do câncer de mama, assim como em investigações que definam com precisão o tecido de origem dos miRNAs em VEs produzidos em resposta ao exercício. Esses estudos poderão oferecer um panorama mais claro dos mecanismos responsáveis pela modulação mediada pelo exercício e contribuir para otimizar intervenções terapêuticas baseadas em treinamento físico.

REFERÊNCIAS

ABE, S. et al. Preoperative sarcopenia is a poor prognostic factor in lower rectal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy: a retrospective study. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 1, p. 141–153, jan. 2022.

ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. Disponível em: <<https://www.acsm.org/education-resources/books/guidelines-exercise-testing-prescription>>. Acesso em: 3 mar. 2024.

ADAMS, B. D. et al. Exercise and weight loss interventions and miRNA expression in women with breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 170, n. 1, p. 55–67, jul. 2018.

ADAMS, S. C. et al. Impact of resistance and aerobic exercise on sarcopenia and dynapenia in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a multicenter randomized controlled trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 158, n. 3, p. 497–507, ago. 2016.

ADAMS, S. C. et al. Effects of high-intensity aerobic interval training on cardiovascular disease risk in testicular cancer survivors: A phase 2 randomized controlled trial. **Cancer**, v. 123, n. 20, p. 4057–4065, 15 out. 2017.

ADAMSEN, L. et al. The effect of a multidimensional exercise intervention on physical capacity, well-being and quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 14, n. 2, p. 116–127, fev. 2006.

ADAMSEN, L. et al. Effect of a multimodal high intensity exercise intervention in cancer patients undergoing chemotherapy: randomised controlled trial. **BMJ**, v. 339, n. oct13 1, p. b3410–b3410, 20 out. 2009.

ADHAMI, M. et al. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. **Breast Cancer (Tokyo, Japan)**, v. 25, n. 2, p. 198–205, mar. 2018.

AFZAL, M. et al. The Effect of Physical Activity/Exercise on miRNA Expression and Function in Non-Communicable Diseases—A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 6813, 21 jun. 2024.

ALIZADEH, S. et al. Effect of a high-intensity interval training on serum microRNA levels in women with breast cancer undergoing hormone therapy. A single-blind randomized trial. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 62, n. 5, p. 329–335, set. 2019.

AMITANI, M. et al. Skeletal muscle loss during neoadjuvant chemotherapy predicts poor prognosis in patients with breast cancer. **BMC cancer**, v. 22, n. 1, p. 327, 26 mar. 2022.

ANSUND, J. et al. High intensity exercise during breast cancer chemotherapy - effects on long-term myocardial damage and physical capacity - data from the OptiTrain RCT. **Cardio-Oncology**, v. 7, n. 1, p. 7, dez. 2021.

AOI, W.; SAKUMA, K. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 39, 2014.

APARICIO-PUERTA, E. et al. sRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W530, 22 maio 2019.

ARGILÉS, J. M. et al. Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential targets for intervention. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 22, p. 100–106, jun. 2015.

ARGUDO, N. et al. Feasibility, tolerability, and effects of exercise-based prehabilitation after neoadjuvant therapy in esophagogastric cancer patients undergoing surgery: an interventional pilot study. **Diseases of the Esophagus**, v. 34, n. 4, p. doaa086, 7 abr. 2021.

ASHRAFIZADEH, M. et al. Non-coding RNA-based regulation of inflammation. **Seminars in Immunology**, v. 59, p. 101606, jan. 2022.

BACON, A. P. et al. VO₂max trainability and high intensity interval training in humans: a meta-analysis. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e73182, 2013.

BAGGISH, A. L. et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 116, n. 5, p. 522–531, 1 mar. 2014.

BAHIRAEE, A. et al. The role of inflammation and its related microRNAs in breast cancer: A narrative review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 19480–19493, nov. 2019.

BANERJEE, S. et al. Vigorous intensity aerobic interval exercise in bladder cancer patients prior to radical cystectomy: a feasibility randomised controlled trial. **Supportive Care in Cancer**, 27 nov. 2017.

BARACOS, V. E. et al. Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 17105, 18 jan. 2018.

BARACOS, V. E.; MAZURAK, V. C.; BHULLAR, A. S. Cancer cachexia is defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass. **Annals of Palliative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 3–12, jan. 2019.

BARNETT, C. et al. Muscle metabolism during sprint exercise in man: influence of sprint training. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 7, n. 3, p. 314–322, set. 2004.

BARTLETT, D. B. et al. The Effects of 16 Weeks of Exercise Training on Neutrophil Functions in Breast Cancer Survivors. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 733101, 27 out. 2021.

BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. **Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media**, v. 3, n. 1, p. 361–362, 19 mar. 2009.

- BEAVER, W. L.; WASSERMAN, K.; WHIPP, B. J. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 60, n. 6, p. 2020–2027, jun. 1986.
- BELL, G. J. et al. Effect of concurrent strength and endurance training on skeletal muscle properties and hormone concentrations in humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 81, n. 5, p. 418–427, 11 fev. 2000.
- BELL, R. A.; BALDI, J. C.; JONES, L. M. Additional cardiovascular fitness when progressing from moderate- to high-intensity exercise training in previously trained breast cancer survivors. **Supportive Care in Cancer**, v. 29, n. 11, p. 6645–6650, nov. 2021.
- BERKEL, A. E. M. et al. Effects of Community-based Exercise Prehabilitation for Patients Scheduled for Colorectal Surgery With High Risk for Postoperative Complications: Results of a Randomized Clinical Trial. **Annals of Surgery**, v. 275, n. 2, p. e299–e306, fev. 2022.
- BHATIA, C.; KAYSER, B. Preoperative high-intensity interval training is effective and safe in deconditioned patients with lung cancer: A randomized clinical trial. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 51, n. 9, p. 712–718, 2019.
- BJØRKE, A. C. H. et al. Exploring Moderators of the Effect of High vs. Low-to-Moderate Intensity Exercise on Cardiorespiratory Fitness During Breast Cancer Treatment – Analyses of a Subsample From the Phys-Can RCT. **Frontiers in Sports and Active Living**, v. 4, p. 902124, 12 jul. 2022.
- BLOOMQUIST, K. et al. High-intensity interval training and thromboembolic events during chemotherapy for testicular cancer: a retrospective analysis from the *Body & Cancer* cohort. **Acta Oncologica**, v. 62, n. 6, p. 666–672, 3 jun. 2023.
- BOEKEL, N. B. et al. Cardiovascular disease incidence after internal mammary chain irradiation and anthracycline-based chemotherapy for breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 4, p. 408–418, ago. 2018.
- BOEREBOOM, C. L. et al. Short-term pre-operative high-intensity interval training does not improve fitness of colorectal cancer patients. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 29, n. 9, p. 1383–1391, set. 2019.
- BOJESEN, R. D. et al. Fit for Surgery—feasibility of short-course multimodal individualized prehabilitation in high-risk frail colon cancer patients prior to surgery. **Pilot and Feasibility Studies**, v. 8, n. 1, p. 11, 21 jan. 2022.
- BOK, D.; RAKOVAC, M.; FOSTER, C. An Examination and Critique of Subjective Methods to Determine Exercise Intensity: The Talk Test, Feeling Scale, and Rating of Perceived Exertion. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 52, n. 9, p. 2085–2109, set. 2022.
- BORG, G. Perceived exertion as an indicator of somatic stress. **Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 2, n. 2, p. 92–98, 1970.

BOUCHARD, C.; THIBAUT, M.-C.; JOBIN, J. Advances in selected areas of human work physiology. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 24, n. S2, p. 1–36, 1981.

BOULAY, M. R. et al. Specificity of aerobic and anaerobic work capacities and powers. **International Journal of Sports Medicine**, v. 6, n. 6, p. 325–328, dez. 1985.

BRAHMER, A. et al. Considerations for the Analysis of Small Extracellular Vesicles in Physical Exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 576150, 2020.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BROWN, L.; WEIR, J. ASEP Procedures recommendation I: Accurate assessment of muscular strength and power. **Journal of Exercise Physiology Online**, v. 4, p. 1–21, 1 ago. 2001.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 43, n. 5, p. 313–338, maio 2013a.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part II: anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 43, n. 10, p. 927–954, out. 2013b.

CAMPBELL, K. L. et al. Exercise Guidelines for Cancer Survivors: Consensus Statement from International Multidisciplinary Roundtable. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 51, n. 11, p. 2375–2390, nov. 2019.

CAMPOS, M. P. O. et al. Cancer-related fatigue: a practical review. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 22, n. 6, p. 1273–1279, jun. 2011.

Cancer Treatment | Survivor Facts & Figures | American Cancer Society. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/survivor-facts-figures.html>>. Acesso em: 3 mar. 2024.

CHAKRABORTY, C. et al. The Interplay among miRNAs, Major Cytokines, and Cancer-Related Inflammation. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**, v. 20, p. 606, 11 abr. 2020.

CHEANG, M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 20 maio 2009.

CHOI, H.-E. et al. The efficacy and safety of high-intensity interval training in chemotherapy-related cardiomyopathy: Report of two cases. **Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 68, n. 2, p. 290–294, 1 jun. 2022.

CHOW, L. S. et al. Exerkines in health, resilience and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 18, n. 5, p. 273–289, maio 2022.

COLEMAN, E. A. et al. Fatigue, Sleep, Pain, Mood and Performance Status in Patients with Multiple Myeloma. **Cancer nursing**, v. 34, n. 3, p. 219–227, 2011.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 255–289, 2014.

CONCEIÇÃO, M. S. et al. Augmented Anabolic Responses after 8-wk Cycling with Blood Flow Restriction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 51, n. 1, p. 84–93, jan. 2019.

COURNEYA, K. S. et al. Effects of aerobic and resistance exercise in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a multicenter randomized controlled trial. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 28, p. 4396–4404, 1 out. 2007.

DE PAULO, T. R. S. et al. Comparing exercise responses to aerobic plus resistance training between postmenopausal breast cancer survivors undergoing aromatase inhibitor therapy and healthy women. **Disability and Rehabilitation**, v. 41, n. 18, p. 2175–2182, set. 2019.

DEL PRETE, A. et al. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 20, n. 5, p. 432–447, maio 2023.

DETHLEFSEN, C. et al. Exercise regulates breast cancer cell viability: systemic training adaptations versus acute exercise responses. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 159, n. 3, p. 469–479, out. 2016.

DETHLEFSEN, C.; PEDERSEN, K. S.; HOJMAN, P. Every exercise bout matters: linking systemic exercise responses to breast cancer control. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 162, n. 3, p. 399–408, abr. 2017.

DEVIN, J. L. et al. The influence of high-intensity compared with moderate-intensity exercise training on cardiorespiratory fitness and body composition in colorectal cancer survivors: a randomised controlled trial. **Journal of Cancer Survivorship**, v. 10, n. 3, p. 467–479, jun. 2016.

DEVIN, J. L. et al. Cardiorespiratory Fitness and Body Composition Responses to Different Intensities and Frequencies of Exercise Training in Colorectal Cancer Survivors. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 17, n. 2, p. e269–e279, jun. 2018.

DIAS-DA-SILVA, G. et al. High-Intensity Interval Training for Cancer Patients: A Review of Key Considerations for Exercise Prescription. **Sports Medicine**, 27 nov. 2024.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S34-45, nov. 2007.

- DJURHUUS, S. S. et al. Exercise training to increase tumour natural killer-cell infiltration in men with localised prostate cancer: a randomised controlled trial. **BJU International**, v. 131, n. 1, p. 116–124, jan. 2023.
- DOLAN, L. B. et al. Interval versus continuous aerobic exercise training in breast cancer survivors—a pilot RCT. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 1, p. 119–127, jan. 2016.
- DUFRESNE, S. et al. A Review of Physical Activity and Circulating miRNA Expression: Implications in Cancer Risk and Progression. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 27, n. 1, p. 11–24, jan. 2018.
- DUNNE, D. F. J. et al. Randomized clinical trial of prehabilitation before planned liver resection. **British Journal of Surgery**, v. 103, n. 5, p. 504–512, 16 mar. 2016.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG) et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. **Lancet (London, England)**, v. 378, n. 9804, p. 1707–1716, 12 nov. 2011.
- EDVARDBSEN, E. et al. High-intensity training following lung cancer surgery: a randomised controlled trial. **Thorax**, v. 70, n. 3, p. 244–250, 1 mar. 2015.
- EGEGAARD, T. et al. Pre-radiotherapy daily exercise training in non-small cell lung cancer: A feasibility study. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 24, n. 4, p. 375–382, jul. 2019.
- ELSARRAJ, H. S. et al. Emerging Functions of microRNA-146a/b in Development and Breast Cancer: MicroRNA-146a/b in Development and Breast Cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 79, 19 fev. 2012.
- FANG, Y. et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 55, n. 6, p. 1852–1862, jun. 2012.
- FIGUEIRA, A. C. C. et al. Efficacy of Exercise on Breast Cancer Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis of Preclinical Data. **International Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 5, p. 327–342, maio 2018.
- FOULKES, S. J. et al. Exercise for the Prevention of Anthracycline-Induced Functional Disability and Cardiac Dysfunction: The BREXIT Study. **Circulation**, v. 147, n. 7, p. 532–545, 14 fev. 2023.
- FREITAG, N. et al. High-intensity interval training and hyperoxia during chemotherapy: A case report about the feasibility, safety and physical functioning in a colorectal cancer patient. **Medicine**, v. 97, n. 24, p. e11068, jun. 2018.

FRIEDENREICH, C. M.; RYDER-BURBIDGE, C.; MCNEIL, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 3, p. 790–800, mar. 2021.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, jan. 2009.

FRÜHBEIS, C. et al. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, p. 28239, 2015.

FYFE, J. J. et al. Enhanced skeletal muscle ribosome biogenesis, yet attenuated mTORC1 and ribosome biogenesis-related signalling, following short-term concurrent versus single-mode resistance training. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 560, 12 jan. 2018.

GALÁN-RIOJA, M. Á. et al. Relative Proximity of Critical Power and Metabolic/Ventilatory Thresholds: Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 50, n. 10, p. 1771–1783, out. 2020.

GARDINER, C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, p. 32945, 2016.

GENTON, L. et al. Dual-energy X-ray absorptiometry and body composition: differences between devices and comparison with reference methods. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 18, n. 1, p. 66–70, jan. 2002.

GIAQUINTO, A. N. et al. Breast Cancer Statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 6, p. 524–541, nov. 2022.

GIBALA, M. J.; HAWLEY, J. A. Sprinting Toward Fitness. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 988–990, 2 maio 2017.

GONG, J. et al. Reduced Cardiorespiratory Fitness and Increased Cardiovascular Mortality After Prolonged Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. **JACC. CardioOncology**, v. 2, n. 4, p. 553–563, nov. 2020.

GÖRGENS, S. W. et al. Exercise and Regulation of Adipokine and Myokine Production. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 135, p. 313–336, 2015.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27, 16 jul. 2019.

GUIGNI, B. A. et al. Skeletal muscle atrophy and dysfunction in breast cancer patients: role for chemotherapy-derived oxidant stress. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 315, n. 5, p. C744–C756, 1 nov. 2018.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, ago. 2014.

- HAN, C. et al. Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 428371, 18 maio 2014.
- HAN, R. et al. MicroRNA-146a negatively regulates inflammation via the IRAK1/TRAF6/NF- κ B signaling pathway in dry eye. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11192, 11 jul. 2023.
- HANSEN, D. et al. Endurance exercise intensity determination in the rehabilitation of coronary artery disease patients: a critical re-appraisal of current evidence. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 42, n. 1, p. 11–30, 1 jan. 2012.
- HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738–749, 6 nov. 2014.
- HAYES, S. C. et al. The Exercise and Sports Science Australia position statement: Exercise medicine in cancer management. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 22, n. 11, p. 1175–1199, nov. 2019.
- HECK, H.; SCHULZ, H.; BARTMUS, U. Diagnostics of anaerobic power and capacity. **European Journal of Sport Science**, v. 3, n. 3, p. 1–23, jun. 2003.
- HERMEKING, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 2, p. 193–199, fev. 2010.
- HERRANZ-GÓMEZ, A. et al. Effectiveness of HIIT in patients with cancer or cancer survivors: An umbrella and mapping review with meta-meta-analysis. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 32, n. 11, p. 1522–1549, nov. 2022.
- HERRERO, F. et al. Combined aerobic and resistance training in breast cancer survivors: A randomized, controlled pilot trial. **International Journal of Sports Medicine**, v. 27, n. 7, p. 573–580, jul. 2006.
- HOFMAN, M. et al. Cancer-related fatigue: the scale of the problem. **The Oncologist**, v. 12 Suppl 1, p. 4–10, 2007.
- HOJMAN, P. et al. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 3, p. E504-510, set. 2011.
- HOJMAN, P. et al. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 10–21, 9 jan. 2018.
- HONG, B. S. et al. Tumor Suppressor miRNA-204-5p Regulates Growth, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 7, p. 1520–1534, 1 abr. 2019.
- HOWLEY, E. T.; BASSETT, D. R.; WELCH, H. G. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 27, n. 9, p. 1292–1301, set. 1995.

HUDSON, R. S. et al. MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 8, p. 3689–3703, abr. 2012.

HWANG, C.-L. et al. Effects of exercise training on exercise capacity in patients with non-small cell lung cancer receiving targeted therapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, n. 12, p. 3169–3177, dez. 2012.

IANNETTA, D. et al. A Critical Evaluation of Current Methods for Exercise Prescription in Women and Men. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 52, n. 2, p. 466–473, fev. 2020.

ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; STRUHL, K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 693–706, 13 nov. 2009.

ISANEJAD, A. et al. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. **Life Sciences**, v. 151, p. 30–40, 15 abr. 2016.

ISANEJAD, A. et al. Comparison of the effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous training on inflammatory markers, cardiorespiratory fitness, and quality of life in breast cancer patients. **Journal of Sport and Health Science**, v. 12, n. 6, p. 674–689, nov. 2023.

JAMNICK, N. A. et al. An Examination and Critique of Current Methods to Determine Exercise Intensity. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 50, n. 10, p. 1729–1756, out. 2020.

JANSSON, M. D.; LUND, A. H. MicroRNA and cancer. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 6, p. 590–610, dez. 2012.

JONES, L. W. et al. Cardiopulmonary function and age-related decline across the breast cancer survivorship continuum. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 20, p. 2530–2537, 10 jul. 2012.

JONES, L. W. et al. Modulation of circulating angiogenic factors and tumor biology by aerobic training in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 6, n. 9, p. 925–937, set. 2013.

JONES, L. W.; EVES, N. D.; SCOTT, J. M. Bench-to-Bedside Approaches for Personalized Exercise Therapy in Cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting**, v. 37, p. 684–694, 2017.

JULIO, U. F. et al. Effect of protocol manipulation for determining maximal aerobic power on a treadmill and cycle ergometer: a brief review. **Strength and Conditioning Journal**, v. 39, n. 5, p. 58–71, 2017.

KAMIŃSKA, M. et al. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny = Menopause Review**, v. 14, n. 3, p. 196–202, set. 2015.

- KAMPSHOFF, C. S. et al. Randomized controlled trial of the effects of high intensity and low-to-moderate intensity exercise on physical fitness and fatigue in cancer survivors: results of the Resistance and Endurance exercise After ChemoTherapy (REACT) study. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 275, dez. 2015.
- KANEHISA, M. et al. KEGG: biological systems database as a model of the real world. **Nucleic Acids Research**, p. gkae909, 17 out. 2024.
- KANG, D.-W. et al. Effects of Exercise on Cardiorespiratory Fitness and Biochemical Progression in Men With Localized Prostate Cancer Under Active Surveillance: The ERASE Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncology**, v. 7, n. 10, p. 1487, 1 out. 2021.
- KARENOVICS, W. et al. Short-term preoperative exercise therapy does not improve long-term outcome after lung cancer surgery: a randomized controlled study†. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 52, n. 1, p. 47–54, jul. 2017.
- KARIMI, N. et al. Tetraspanins distinguish separate extracellular vesicle subpopulations in human serum and plasma - Contributions of platelet extracellular vesicles in plasma samples. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 11, n. 5, p. e12213, maio 2022.
- KARPMAN, V. L. [The theoretical analysis of Fick's equation. On the centennial of the use of Fick's principle in physiology]. **Zeitschrift Fur Kardiologie**, v. 64, n. 9, p. 801–808, set. 1975.
- KATCH, V. et al. Validity of the relative percent concept for equating training intensity. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 39, n. 4, p. 219–227, 20 out. 1978.
- KAZEMI-BAJESTANI, S. M. R.; MAZURAK, V. C.; BARACOS, V. Computed tomography-defined muscle and fat wasting are associated with cancer clinical outcomes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 54, p. 2–10, jun. 2016.
- KEIR, D. A. et al. Identification of Non-Invasive Exercise Thresholds: Methods, Strategies, and an Online App. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 52, n. 2, p. 237–255, fev. 2022.
- KERRIGAN, D. J. et al. Cardiac Rehabilitation Improves Fitness in Patients With Subclinical Markers of Cardiotoxicity While Receiving Chemotherapy: A RANDOMIZED CONTROLLED STUDY. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 43, n. 2, p. 129–134, mar. 2023.
- KHALIGHFARD, S. et al. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. **Scientific Reports**, v. 8, p. 17981, 19 dez. 2018.
- KHOSRAVI, N. et al. Exercise training, circulating cytokine levels and immune function in cancer survivors: A meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, p. 92–104, out. 2019.
- KHOURI, M. G. et al. Cancer Therapy-Induced Cardiac Toxicity in Early Breast Cancer: Addressing the Unresolved Issues. **Circulation**, v. 126, n. 23, p. 2749–2763, 4 dez. 2012.

- KIM, C.-J. et al. Cardiopulmonary responses and adherence to exercise in women newly diagnosed with breast cancer undergoing adjuvant therapy. **Cancer Nursing**, v. 29, n. 2, p. 156–165, 2006.
- KIRKHAM, A. A. et al. A Longitudinal Study of the Association of Clinical Indices of Cardiovascular Autonomic Function with Breast Cancer Treatment and Exercise Training. **The Oncologist**, v. 24, n. 2, p. 273–284, fev. 2019.
- KOEVOETS, E. W. et al. Effect of physical exercise on cognitive function after chemotherapy in patients with breast cancer: a randomized controlled trial (PAM study). **Breast Cancer Research**, v. 24, n. 1, p. 36, dez. 2022.
- KOKKINOS, P. et al. Cardiorespiratory Fitness and Mortality Risk Across the Spectra of Age, Race, and Sex. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 80, n. 6, p. 598–609, 9 ago. 2022.
- KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 8 jan. 2019.
- LAURSEN, P.; BLANCHARD, M.; JENKINS, D. Acute High-Intensity Interval Training Improves T vent and Peak Power Output in Highly Trained Males. **Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquée**, v. 27, p. 336–48, 1 set. 2002.
- LAVÍN-PÉREZ, A. M. et al. High-intensity exercise to improve cardiorespiratory fitness in cancer patients and survivors: A systematic review and meta-analysis. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 31, n. 2, p. 265–294, fev. 2021.
- LEE, K. et al. Feasibility of high intensity interval training in patients with breast Cancer undergoing anthracycline chemotherapy: a randomized pilot trial. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 653, dez. 2019.
- LEHTONEN, E. et al. Hierarchical framework to improve individualised exercise prescription in adults: a critical review. **BMJ open sport & exercise medicine**, v. 8, n. 2, p. e001339, 2022.
- LEWIECKI, E. M. et al. Report of the International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult Position Development Conference and Official Positions. **Southern Medical Journal**, v. 101, n. 7, p. 735–739, jul. 2008.
- LI, W. (JESS) et al. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 640587, 8 mar. 2021.
- LIAO, Z.; ZHENG, R.; SHAO, G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 51, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2023.

LICKER, M. et al. Short-Term Preoperative High-Intensity Interval Training in Patients Awaiting Lung Cancer Surgery: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 12, n. 2, p. 323–333, fev. 2017.

LINDNER, R. et al. Moderate to Vigorous-intensity Continuous Training versus Highintensity Interval Training for Improving VO₂max in Women: A Systematic Review and Meta-analysis. **International Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 7, p. 484–495, jun. 2023.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 14 jul. 2017.

LU, C. et al. Long Non-Coding RNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Breast Cancer: Progress and Prospects. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 30 ago. 2021.

MACDONALD, G. et al. A pilot study of high-intensity interval training in older adults with treatment naïve chronic lymphocytic leukemia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23137, 30 nov. 2021.

MACINTOSH, B. R. et al. What Is Moderate to Vigorous Exercise Intensity? **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 682233, 22 set. 2021.

MADZIMA, T. A. et al. Effects of Resistance Training and Protein Supplementation in Breast Cancer Survivors. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 49, n. 7, p. 1283–1292, jul. 2017.

MAGINADOR, G. et al. Aerobic Exercise-Induced Changes in Cardiorespiratory Fitness in Breast Cancer Patients Receiving Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2240, 11 ago. 2020.

MARTIN, E. et al. Higher-Intensity Exercise Results in More Sustainable Improvements for VO₂peak for Breast and Prostate Cancer Survivors. **Oncology Nursing Forum**, v. 42, n. 3, 1 maio 2015.

MCILVENNA, L. C. et al. Single vesicle analysis reveals the release of tetraspanin positive extracellular vesicles into circulation with high intensity intermittent exercise. **The Journal of Physiology**, v. 601, n. 22, p. 5093–5106, nov. 2023.

MCKELVEY, K. J. et al. Exosomes: Mechanisms of Uptake. **Journal of Circulating Biomarkers**, v. 4, p. 7, 2015.

MERICO, D. et al. Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13984, 15 nov. 2010.

MEYER, T. et al. Is lactic acidosis a cause of exercise induced hyperventilation at the respiratory compensation point? **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 5, p. 622–625, out. 2004.

- MEYLER, S. et al. Variability in exercise tolerance and physiological responses to exercise prescribed relative to physiological thresholds and to maximum oxygen uptake. **Experimental Physiology**, v. 108, n. 4, p. 581–594, abr. 2023.
- MIJWEL, S. et al. Highly favorable physiological responses to concurrent resistance and high-intensity interval training during chemotherapy: the OptiTrain breast cancer trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 169, n. 1, p. 93–103, maio 2018.
- MILACIC, M. et al. The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. D1, p. D672–D678, 5 jan. 2024.
- MILANOVIĆ, Z.; SPORIŠ, G.; WESTON, M. Effectiveness of High-Intensity Interval Training (HIT) and Continuous Endurance Training for VO₂max Improvements: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 45, n. 10, p. 1469–1481, out. 2015.
- MINNELLA, E. M. et al. Effect of two different pre-operative exercise training regimens before colorectal surgery on functional capacity: A randomised controlled trial. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 37, n. 11, p. 969–978, nov. 2020.
- MINNELLA, E. M. et al. Prehabilitation in Thoracic Cancer Surgery: From Research to Standard of Care. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 35, n. 11, p. 3255–3264, nov. 2021.
- MIRICESCU, D. et al. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 173, jan. 2021.
- MØLLER, T. et al. The challenge of preserving cardiorespiratory fitness in physically inactive patients with colon or breast cancer during adjuvant chemotherapy: a randomised feasibility study. **BMJ Open Sport & Exercise Medicine**, v. 1, n. 1, p. e000021, out. 2015.
- MONGROO, P. S.; RUSTGI, A. K. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 3, p. 219, 1 ago. 2010.
- MONTAÑO-ROJAS, L. S. et al. Resistance Training in Breast Cancer Survivors: A Systematic Review of Exercise Programs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 6511, 7 set. 2020.
- MORI, M. A. et al. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 656–673, 1 out. 2019.
- MUGELE, H. et al. High-intensity interval training in the therapy and aftercare of cancer patients: a systematic review with meta-analysis. **Journal of Cancer Survivorship: Research and Practice**, v. 13, n. 2, p. 205–223, abr. 2019.

MUNN, Z. et al. Systematic review or scoping review? Guidance for authors when choosing between a systematic or scoping review approach. **BMC Medical Research Methodology**, v. 18, n. 1, p. 143, 19 nov. 2018.

NAVES, J. P. A. et al. Effects of High-Intensity Interval Training vs. Sprint Interval Training on Anthropometric Measures and Cardiorespiratory Fitness in Healthy Young Women. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1738, 2018.

NEDERVEEN, J. P. et al. Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 1 fev. 2021.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 19 jul. 2017.

NEUENDORF, T. et al. Effects of high-intensity interval training on functional performance and maximal oxygen uptake in comparison with moderate intensity continuous training in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v. 31, n. 11, p. 643, 2023.

NORTHEY, J. M. et al. Cognition in breast cancer survivors: A pilot study of interval and continuous exercise. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 22, n. 5, p. 580–585, maio 2019.

OLIVE, V.; JIANG, I.; HE, L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 8, p. 1348–1354, ago. 2010.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

OZGA, A. J.; CHOW, M. T.; LUSTER, A. D. Chemokines and the immune response to cancer. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 859–874, 11 maio 2021.

PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ**, v. 372, p. n71, 29 mar. 2021.

PALMA, S. et al. High-intensity interval training in the prehabilitation of cancer patients-a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 29, n. 4, p. 1781–1794, abr. 2021.

PANISSA, V. L. G. et al. Is Oxygen Uptake Measurement Enough to Estimate Energy Expenditure During High-Intensity Intermittent Exercise? Quantification of Anaerobic Contribution by Different Methods. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 868, 2018.

PANOUTSOPOULOU, K. et al. Repression of miR-146a in predicting poor treatment outcome in triple-negative breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 114, p. 43–51, 1 abr. 2023.

PARTRIDGE, A. H.; BURSTEIN, H. J.; WINER, E. P. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 30, p. 135–142, 2001.

PEDERSEN, B. K. Muscles and their myokines. **The Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. Pt 2, p. 337–346, 15 jan. 2011.

PERSOON, S. et al. Randomized controlled trial on the effects of a supervised high intensity exercise program in patients with a hematologic malignancy treated with autologous stem cell transplantation: Results from the EXIST study. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181313, 20 jul. 2017.

PETRI, B. J.; KLINGE, C. M. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. **Cancer metastasis reviews**, v. 39, n. 3, p. 837, set. 2020.

PIRAUX, E. et al. High-intensity aerobic interval training and resistance training are feasible in rectal cancer patients undergoing chemoradiotherapy: a feasibility randomized controlled study. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy: Journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology**, v. 27, n. 2, p. 198–208, 2022.

POLLÁN, M. et al. Exercise and cancer: a position statement from the Spanish Society of Medical Oncology. **Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 22, n. 10, p. 1710–1729, out. 2020.

PULLIERO, A. et al. Anticancer effect of physical activity is mediated by modulation of extracellular microRNA in blood. **Oncotarget**, v. 11, n. 22, p. 2106–2119, 2 jun. 2020.

RAISCH, J.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; NGUYEN, H. T. T. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 20, p. 2985, 28 maio 2013.

RELJIC, D. et al. Feasibility, Safety, and Preliminary Efficacy of Very Low-Volume Interval Training in Advanced Cancer Patients. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 54, n. 11, p. 1817–1830, nov. 2022.

RIGAMONTI, A. E. et al. Effects of an acute bout of exercise on circulating extracellular vesicles: tissue-, sex-, and BMI-related differences. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 44, n. 5, p. 1108–1118, maio 2020.

ROSENBLAT, M. et al. Programming Interval Training to Optimize Time-Trial Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine**, v. 51, 1 ago. 2021.

ROSENBLAT, M. A.; GRANATA, C.; THOMAS, S. G. Effect of Interval Training on the Factors Influencing Maximal Oxygen Consumption: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 52, n. 6, p. 1329–1352, jun. 2022.

ROXBURGH, C. S. D.; MCMILLAN, D. C. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 6, p. 1409–1412, 18 mar. 2014.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 203–222, mar. 2017.

RUSSO, A. et al. Physical Activity Modulates the Overexpression of the Inflammatory miR-146a-5p in Obese Patients. **IUBMB life**, v. 70, n. 10, p. 1012–1022, out. 2018.

SADOVSKA, L. et al. Exercise-Induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 11 jan. 2022.

SAFDAR, A.; SALEEM, A.; TARNOPOLSKY, M. A. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 12, n. 9, p. 504–517, set. 2016.

SAFDAR, A.; TARNOPOLSKY, M. A. Exosomes as Mediators of the Systemic Adaptations to Endurance Exercise. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. a029827, mar. 2018.

SALVI, R. et al. Preoperative high-intensity training in frail old patients undergoing pulmonary resection for NSCLC. **Open Medicine**, v. 11, n. 1, p. 443–448, 1 jan. 2016.

SAMHAN, A. F. et al. Effects of High-Intensity Interval Training on Cardiorespiratory Fitness, Body Composition, and Quality of Life in Overweight and Obese Survivors of Breast Cancer. **Rehabilitation Oncology**, v. 39, n. 4, p. 168–174, out. 2021.

SCHMID, D.; LEITZMANN, M. F. Association between physical activity and mortality among breast cancer and colorectal cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 25, n. 7, p. 1293–1311, jul. 2014.

SCHMID, D.; LEITZMANN, M. F. Cardiorespiratory fitness as predictor of cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 272–278, fev. 2015.

SCHMITT, J. et al. A 3-week multimodal intervention involving high-intensity interval training in female cancer survivors: a randomized controlled trial. **Physiological Reports**, v. 4, n. 3, p. e12693, fev. 2016.

SCHMITZ, K. H. et al. Safety and efficacy of weight training in recent breast cancer survivors to alter body composition, insulin, and insulin-like growth factor axis proteins. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 14, n. 7, p. 1672–1680, jul. 2005.

SCHULZ, S. V. W. et al. Feasibility and effects of a combined adjuvant high-intensity interval/strength training in breast cancer patients: a single-center pilot study. **Disability and Rehabilitation**, v. 40, n. 13, p. 1501–1508, 19 jun. 2018.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.

SHINDE, S. S. et al. Therapeutic Delivery of Tumor Suppressor miRNAs for Breast Cancer Treatment. **Biology**, v. 12, n. 3, p. 467, mar. 2023.

SHOOKSTER, D. et al. Accuracy of Commonly Used Age-Predicted Maximal Heart Rate Equations. **International Journal of Exercise Science**, v. 13, n. 7, p. 1242–1250, 1 set. 2020.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, jan. 2019.

SIMON, J. et al. Lactate accumulation relative to the anaerobic and respiratory compensation thresholds. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 54, n. 1, p. 13–17, jan. 1983.

SIQUEIRA, I. R. et al. Potential involvement of circulating extracellular vesicles and particles on exercise effects in malignancies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, 3 mar. 2023.

SMYTH, E. et al. Preoperative high intensity interval training for oncological resections: A systematic review and meta-analysis. **Surgical Oncology**, v. 38, p. 101620, set. 2021.

STEFANELLI, F. et al. High-intensity training and cardiopulmonary exercise testing in patients with chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer undergoing lobectomy. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 44, n. 4, p. e260–e265, 1 out. 2013.

STUART-HARRIS, R. et al. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 17, n. 4, p. 323–334, ago. 2008.

SU, L. et al. Effects of HIIT and MICT on cardiovascular risk factors in adults with overweight and/or obesity: A meta-analysis. **PloS One**, v. 14, n. 1, p. e0210644, 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D638–D646, 6 jan. 2023.

- TAGANOV, K. D. et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12481–12486, 15 ago. 2006.
- TAVIO, M.; MILAN, I.; TIRELLI, U. Cancer-related fatigue (review). **International Journal of Oncology**, v. 21, n. 5, p. 1093–1099, nov. 2002.
- TELLES, G. D. et al. Time Course of Skeletal Muscle miRNA Expression after Resistance, High-Intensity Interval, and Concurrent Exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 53, n. 8, p. 1708–1718, 1 ago. 2021.
- TELLES, G. D. et al. Exercise-Induced Circulating microRNAs: Potential Key Factors in the Control of Breast Cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 800094, 16 jun. 2022.
- THEVENET, D. et al. Influence of recovery mode (passive vs. active) on time spent at maximal oxygen uptake during an intermittent session in young and endurance-trained athletes. **European Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 2, p. 133–142, jan. 2007.
- TOOHEY, K. et al. The impact of high-intensity interval training exercise on breast cancer survivors: a pilot study to explore fitness, cardiac regulation and biomarkers of the stress systems. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 787, dez. 2020.
- TREIBER, T.; TREIBER, N.; MEISTER, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 5–20, jan. 2019.
- TSAI, C.-Y. et al. Interleukin-32 Increases Human Gastric Cancer Cell Invasion Associated with Tumor Progression and Metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 9, p. 2276–2288, 30 abr. 2014.
- TSUJI, K.; MATSUOKA, Y. J.; OCHI, E. High-intensity interval training in breast cancer survivors: a systematic review. **BMC cancer**, v. 21, n. 1, p. 184, 22 fev. 2021.
- TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116–129, fev. 2010.
- VAN WIJK, L. et al. Improved preoperative aerobic fitness following a home-based bimodal prehabilitation programme in high-risk patients scheduled for liver or pancreatic resection. **British Journal of Surgery**, v. 109, n. 11, p. 1036–1039, 14 out. 2022.
- VON HOFF, D. D. et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 91, n. 5, p. 710–717, nov. 1979.
- WA, Q. et al. miR-204-5p Represses Bone Metastasis via Inactivating NF- κ B Signaling in Prostate Cancer. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**, v. 18, p. 567, 18 set. 2019.

- WALLEN, M. P. et al. High-intensity interval training improves cardiorespiratory fitness in cancer patients and survivors: A meta-analysis. **European Journal of Cancer Care**, v. 29, n. 4, p. e13267, jul. 2020.
- WANG, B. et al. Exosomal miR-1910-3p promotes proliferation, metastasis, and autophagy of breast cancer cells by targeting MTMR3 and activating the NF- κ B signaling pathway. **Cancer Letters**, v. 489, p. 87–99, 1 out. 2020.
- WANG, W.; LUO, Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 1, p. 18, jan. 2015.
- WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, fev. 2024.
- WEN, D. et al. Effects of different protocols of high intensity interval training for VO₂max improvements in adults: A meta-analysis of randomised controlled trials. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 22, n. 8, p. 941–947, ago. 2019.
- WEST, M. A. et al. Effect of prehabilitation on objectively measured physical fitness after neoadjuvant treatment in preoperative rectal cancer patients: a blinded interventional pilot study. **British Journal of Anaesthesia**, v. 114, n. 2, p. 244–251, fev. 2015.
- WHITHAM, M. et al. Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 237–251.e4, 9 jan. 2018.
- WHO. **World health statistics 2018 :: monitoring health for the SDGs**. [s.l.] WHO, 2018.
- WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 65, n. 10, p. 1566–1584, maio 2008.
- WOOD, W. A. et al. Personalized home-based interval exercise training may improve cardiorespiratory fitness in cancer patients preparing to undergo hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 51, n. 7, p. 967–972, jul. 2016.
- WOOD, W. A. et al. Lessons learned from a pilot randomized clinical trial of home-based exercise prescription before allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Supportive Care in Cancer**, v. 28, n. 11, p. 5291–5298, nov. 2020.
- YAN, B. et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 539, 3 mar. 2015.
- YEH, E. T. H.; BICKFORD, C. L. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 24, p. 2231–2247, 16 jun. 2009.

YU, G.; WANG, L.-G.; HE, Q.-Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 31, n. 14, p. 2382–2383, 15 jul. 2015.

ZAFEIRIDIS, A. et al. Oxygen Delivery and Muscle Deoxygenation during Continuous, Long- and Short-Interval Exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 11, p. 872–880, nov. 2015.

ZENG, X. et al. MicroRNA-381—A Key Transcriptional Regulator: Its Biological Function and Clinical Application Prospects in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 26 nov. 2020.

ANEXO I

Carta de autorização para o desenvolvimento do projeto



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
HOSPITAL DA MULHER PROF. DR. JOSÉ ARISTODEMO PINOTTI



DECLARAÇÕES DE GERENCIAMENTO E RESPONSABILIDADE
INSTITUCIONAL

Ao Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP)/ UNICAMP

Declaramos, a fim de viabilizar a constituição do Biobanco do CAISM, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian, que o Hospital da Mulher Prof. José Aristodemo Pinotti - UNICAMP assume a responsabilidade de fazer cumprir os termos das Resoluções nº 466/12, de 12 de dezembro de 2012, e 441/11, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde e demais resoluções complementares pertinentes ao armazenamento de amostras humanas para fins de pesquisa. Declaramos ainda que a instituição zelará para que o pesquisador cumpra os objetivos do protocolo de desenvolvimento do Biobanco-CAISM por meio de acompanhamento do departamento de origem dos pesquisadores e apresentação de relatório anual enviado ao CEP PRP/UNICAMP. O responsável pelo Biobanco-CAISM declara ainda que a área do Laboratório de Patologia Especializada do Hospital da Mulher Prof. José Aristodemo Pinotti da FCM-UNICAMP dispõe da infraestrutura necessária para a adequada organização e guarda do material armazenado.

De acordo e ciente, _____

Campinas, 3 de abril de 2020

Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian
Coordenador do Biobanco do CAISM
CPF: 254.725.418-24

Prof. Dr. José Vassallo
Patologista responsável – Laboratório de Patologia Especializada
CPF: 030.737.668-04

Prof. Dr. João Renato Bennini Júnior
Vice-Diretor do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti
CPF: 261.715.998-16

Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – UNICAMP
Rua Alexander Fleming, nº 101 – CEP: 13083-881 – Campinas – São Paulo – Brasil
Telefone: (19) 3521-9333

APÊNDICE I

Sports Medicine
<https://doi.org/10.1007/s40279-024-02145-7>

SYSTEMATIC REVIEW



High-Intensity Interval Training for Cancer Patients: A Review of Key Considerations for Exercise Prescription

Gilmar Dias-da-Silva Jr.^{1,5} · Valéria L. G. Panissa^{2,3,5} · Sophie F. M. Derchain^{2,5} · Marina L. V. Ferreira^{1,5} ·
 Guilherme D. Telles^{4,5} · Glenda B. B. Buzaglo^{1,5} · Rafaela B. Araújo^{1,5} · Felipe C. Vechin^{4,5} · Miguel S. Conceição^{1,5}

Accepted: 24 October 2024
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2024

Abstract

Background High-intensity interval training (HIIT) performed before, during, and after cancer treatment can attenuate the adverse effects induced by anti-cancer drugs. A clear presentation and rationale of characteristics of HIIT variables is vital to produce the expected HIIT adaptations in cancer patients. However, there are concerns regarding the HIIT protocols used in the cancer literature.

Objectives The aims were to (1) identify the characteristics of HIIT and the formats that have been prescribed, (2) analyze which anchors have been utilized to prescribe effort and pause intensity, (3) examine characteristics of the physical tests used for HIIT prescription, and (4) identify potential adverse events related to HIIT intervention.

Methods This scoping review followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR) guidelines, including PubMed, Scopus, and Web of Science databases.

Results A total of 51 studies were retrieved, and the following results were found: (1) Only 25 studies reported all four essential variables for HIIT prescription [effort intensity (effort duration): pause intensity (pause duration)]. Of these studies, 23 used active pause and employed the following prescription (on average): [84% (116 s): 39% (118 s)] when percentage of maximal aerobic power (MAP) [maximal/peak oxygen uptake ($VO_{2max/peak}$)/MAP] was used; [124% (161 s): 55% (142 s)] when percentage of anaerobic threshold (AT) was used; [83% (230 s): 62% (165 s)] when maximal heart rate percentage ($\%HR_{max}$) was used. From these 23 studies, 12 used $VO_{2max/peak}$ /MAP (one of the most recommended variables for HIIT prescription). Seven studies adopted the HIIT-long format, and in the remaining five studies, the format was unclear. (2) Twenty-four studies used fractions of $VO_{2max/peak}$ or mechanical variables like MAP as anchors for prescribing effort intensity, two studies used AT, 20 studies used fractions of HR_{max} /heart rate reserve, two studies used rate of perceived exertion (RPE), while one used RPE and $\%VO_{2peak}$ concomitantly, and two studies utilized RPE/ $\%HR_{max}$ concomitantly. Two studies utilized passive resting, 12 studies used $\%VO_{2peak}/\%MAP$ for prescribing pause intensity, four studies used AT, seven studies used $\%HR_{max}$, one study used $\%HR_{max}/\%VO_{2peak}$, and two studies used absolute loads. (3) Ten studies did not report the characteristics of the physical tests employed, two studies used submaximal tests, and 39 studies utilized graded exercise tests. (4) Ten studies did not report if there were adverse events associated with the exercise program, while 34 studies did not report any adverse events.

Conclusions Only 50% of the studies provided all the necessary variables for accurate HIIT prescription, raising concerns about the replicability, comprehension, and effective application of HIIT in cancer patients. Most of the studies that reported all variables appeared to have employed the HIIT-long format. Only a few studies used more individualized anchors (e.g., AT) to prescribe HIIT-long format for cancer patients, which is considered a very heterogeneous population.

Link para acesso: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-024-02145-7>