

AVALIAÇÃO DA CONCENTREAÇÃO DO LACTATO DESIDROGENASE EM CADELAS PORTADORAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS

(Evaluation of the concentration of lactate dehydrogenase in bitches with mammary gland tumor)

Breno Queiroz PINHEIRO^{1*}; Héliida Tainan Silva BARBOSA¹; Francisco Felipe de MAGALHÃES¹; Carmen Vlândia Soares de SOUZA², Francisco Wesley da Silva ALVES¹; Isaac Neto Góes da SILVA¹; Lúcia Daniel Machado da SILVA¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Av. Dr.Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.714-903; ²Centro de Diagnóstico Veterinário, Fortaleza (VETER). *E-mail: breno.queiroz@uece.br

ABSTRACT

The increase in lactate dehydrogenase (LDH) activity is associated with hypoxia due to the rapid proliferation of cancer cells and high metabolic demands. Few studies have evaluated the LDH concentration in canine mammary tumor (CMT). Thus, the objective of this work was to evaluate serum LDH concentrations in CMT and its association with prognostic factors. Thirty bitches participated in the work and were divided equally into two groups, with and without CMT. The average concentration of LDH was significantly higher in CMT (424.9±244.4 U / L) compared to the control group (299.0±170.3 U / L) and its values were positively correlated with inflammation and / or macroscopic ulceration (r=0.6), tumor size (r=0.5), histopathological grade (r=0.6), metastatic lymph node (r=0.7) and clinical stage (r=0.5).

Key words: Cancer, glycolysis, prognosis.

INTRODUÇÃO

O efeito Warburg, uma marca metabólica do câncer, é comum em vários tipos de neoplasias. Comparado com a fosforilação oxidativa, a glicólise é um caminho de baixa eficiência para a produção de ATP (HSU e SABATINI, 2008). No entanto, fornece vários metabólitos necessários para o rápido crescimento celular. O último passo na glicólise é a conversão do piruvato em lactato, que é catalisado pela lactato desidrogenase (LDH), tendo uma posição essencial no metabolismo celular anaeróbico (ZHAO *et al.*, 2013).

O aumento da atividade do LDH está associado à hipóxia devido à rápida proliferação de células cancerígenas e as altas demandas metabólicas (KOUKOURAKIS *et al.*, 2003). A determinação dos níveis séricos de LDH é bastante útil em pacientes com neoplasias para fins prognósticos, pois seu aumento reflete a carga neoplásica e vem demonstrando correlação negativa com prognóstico, resistência à quimioterapia e à radioterapia (CHEN *et al.*, 2020). A concentração sérica deste analito ajuda a diferenciar neoplasias benignas de malignas e vem sendo relatada em neoplasias humanas de pulmão, colorretais, ginecológicas e de mama (KOUKOURAKIS *et al.*, 2003, 2006, 2009; HUANG *et al.*, 2016).

Na medicina veterinária as neoplasias que mais vem demonstrando o seu aumento são as de células redondas, mais especificamente os linfomas, contudo a sua patogênese ainda é indeterminada (HADDEN *et al.*, 2008). Para outras neoplasias como carcinomas e sarcomas as informações ainda são escassas (MARCONATO *et al.*, 2009). O trabalho de Campos *et al.* (2012) é um dos poucos que avaliaram a concentração de LDH em cadelas com neoplasias de mama (NMC) onde estas apresentaram um resultado positivo e significativo em relação à

evolução da doença, entretanto neste trabalho não foram relatadas relações com os parâmetros prognósticos.

Devido à importância do LDH nas neoplasias e a possibilidade como um biomarcador prognóstico, objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações séricas de LDH nas NMC e sua associação com os fatores prognósticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso Animal (CEUA) da Universidade estadual do Ceará (UECE) com o seguinte número de processo: 01047323/2019.

Animais experimentais

Participaram do trabalho 30 cadelas, selecionadas ao acaso, sem predileção de raça e peso provenientes da rotina de atendimentos do Hospital Veterinário Sylvio Barbosa Cardoso (HVSBC) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) que foram divididas em igualmente em 2 grupos, cadelas com idade entre 6 e 12 anos ($9,0 \pm 2,0$) que apresentaram pelo menos um tumor em glândula mamária e cadelas saldáveis com idade entre 1 e 11 anos ($5,3 \pm 3,0$).

Coleta de dados

Todas as cadelas foram submetidas à realização de hemograma completo, dosagem de analitos hepáticos e renais. Nas cadelas com neoplasia mamária também foram realizadas radiografias torácicas, em três projeções, e ultrassonografia abdominal total e avaliou-se a presença de ulceração e/ou inflamação, tamanho tumoral, que foi determinado de acordo com o diâmetro do maior nódulo (cm) e possibilidade de metástase linfonodal ou a distância.

As mastectomias foram adotadas de acordo com as mamas envolvidas e todas as peças foram fixadas em solução formalina tamponada a 10%, embebidos em parafina e rotineiramente preparados e corados com hematoxilina e eosina (HE). As neoplasias foram classificadas de acordo com Cassali *et al.* (2014). Quando a cadela apresentava múltiplas massas, a neoplasia de pior prognóstico na histopatologia foi escolhida para a análise. Além disso, as neoplasias foram graduadas de acordo com o Nottingham Grading System (ELSTON e ELLIS, 1998).

Para realização das dosagens do LDH, as amostras sanguíneas foram colhidas por venopunção jugular, de modo a se evitar hemólise. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas e o soro aliquoteado e então imediatamente processadas. Foram utilizados *kits* reagentes que se baseiam no método cinético por meio da conversão do piruvato a lactato na presença de NADH.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o RStudio versão 1.3 (Boston, EUA). One-way ANOVA e teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças nas concentrações entre os grupos estudados. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson para se avaliar a

relação entre valores do LDH com os fatores prognósticos. Todos os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média do LDH foi significativamente maior nas NMC ($424,9 \pm 244,4$ U/L) em comparação com o grupo controle ($299,0 \pm 170,3$ U/L) (Fig. 01).

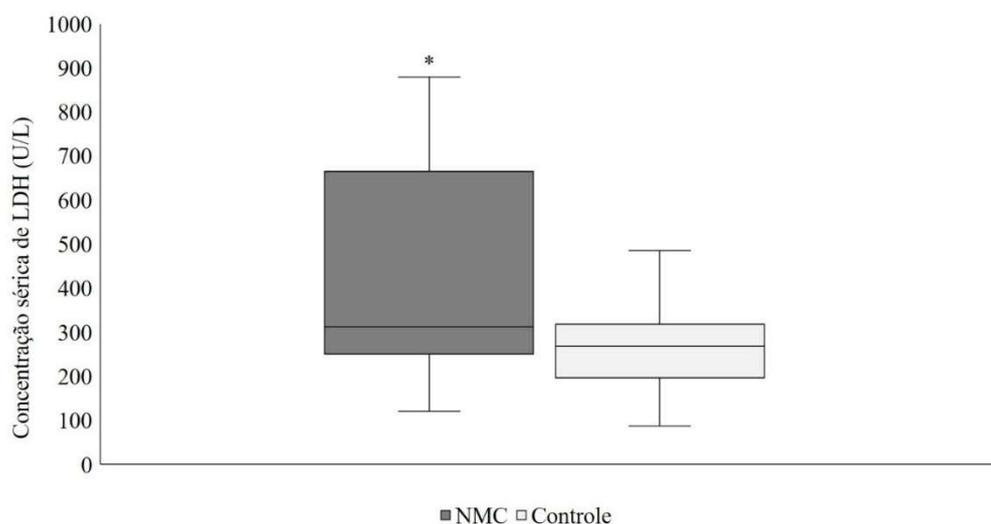


Figura 01: Concentrações séricas de LDH em cadelas portadoras de neoplasias mamárias (NMC) e do grupo controle. *Diferença estatística ($p < 0,05$)

Estes resultados reforçam as informações da literatura que afirmam que o LDH nas células neoplásicas garante um metabolismo anaeróbio / glicolítico eficiente e a redução da dependência de oxigênio (ZHAO *et al.*, 2013). Marconato *et al.* (2009) e Campos *et al.* (2012) também relataram que os cães com neoplasias foram aqueles que apresentaram níveis séricos de LDH significativamente mais altos, sendo esse último trabalho exclusivo com as NMC.

Entre as NCM avaliadas neste trabalho, 3 eram benignos (tumores mistos benignos) e 12 malignos (6 carcinomas em tumor misto, 5 carcinomas tubulares e 1 carcinomas micropapilar). Metástases à distância foram encontradas em 3 cadelas com NMC malignos (2 carcinomas tubulares e 1 carcinomas micropapilar). Entre as neoplasias, 5 eram ulceradas (3 não metastáticas e 2 metastáticas). O tamanho médio entre os nódulos avaliados foi de $6,1 \pm 7,7$ cm. Todos as NMC metastáticas eram maiores que 5 cm (Tab. 01).

A concentração de LDH relacionou-se significativa e positivamente com a inflamação e/ou ulceração macroscópica ($r=0,6$), tamanho do tumor ($r=0,5$), grau histopatológico ($r=0,6$), linfonodo metastático ($r=0,7$) e estadiamento clínico ($r=0,5$) ($p < 0,05$). As concentrações do LDH não se mostraram úteis para a diferenciação entre os estágios do linfoma e do mastocitoma canino (MARCONATO *et al.*, 2009). Já Campos *et al.* (2012) encontraram uma correlação positiva entre a concentração de LDH e o estadiamento clínico nas NCM.

Até onde vai o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a encontrar uma correlação positiva entre inflamação e/ou ulceração macroscópica, tamanho do tumor, grau histopatológico proposto por ELSTON e ELLIS (1998), linfonodo metastático e a concentração do LDH nas NMC.

Tabela 01: Descrição dos parâmetros clínico patológicos observados nas cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

Raça	LDH (U/L)	Tamanho tumor (cm)	Inflamação e/ou ulceração	Histopatológico	Grau	Linfonodo metastático	Estadiamento clínico
Poodle	440	1,5	Não	Ca. tubular	II	Não	I
Golden	879	32	Sim	Ca. tubular	II	Sim	V
	209			Ca. em tumor		Não	
Poodle		3,5	Não	misto	I		II
	706		Sim	Ca.		Não	
SRD		3,8		tubular	I		I
	665		Sim	Ca.			
SRD		8		micropapilar	III	Sim	V
Terrirer brasileiro	259			Tumor		Não	
		0,8	Não	benigno	-		I
	467		Sim	Ca. em tumor		Não	
SRD		7,8		misto	I		III
	564		Sim	Ca. em tumor		Não	
SRD		10		misto	I		III
	287		Não	Ca. em tumor		Não	
Poodle		1,5		misto	I		I
	250		Não	Tumor		Não	
Poodle		3,5		misto			II
	312		Não	benigno	-	Não	
				Ca. em tumor			
SRD		2,5		misto	I		I
	120		Não	Tumor		Não	
				misto			
SRD		6,5		benigno	-		III
	157		Não	Ca. em tumor		Não	
Labrador		5,5		misto	I		III
	256		Não	Ca.		Não	
SRD		1		tubular	I		I
	802		Não	Ca.			
Golden		3,8		tubular	II	Sim	V

CONCLUSÕES

Cadelas com neoplasia mamária apresentam maiores concentrações de LDH que cadelas saudáveis. A produção de LDH parece ser estimulada em nas NMC inflamadas e/ou ulcerados, de maior diâmetro, elevado grau histopatológico, com linfonodo metastático e elevado estadiamento clínico, sugerindo que o LDH pode ser utilizado como potencial biomarcador prognóstico. Mais estudos são desejáveis para avaliar o seu significado quanto à eficácia terapêutica ou recorrência desta neoplasia.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A.; MELGAÇO DE FARIA J.C.; GUIMARÃES J.E.; DUTRA Á.P.; FERREIRA E.; DE SOUSA L.P.; RABELO É.M.L.; VIEIRA DA COSTA A.F.D.; CASSALI G.D. CA15.3, CEA, and LDH 185 in dogs with malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.26, p.1383-1388, 2012.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; BESERRA, H.E. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.7, n.2, p.38-69, 2014.
- CHEN, G.; CAI, Z.; LIN, Z.; WANG, C.; LIANG, Y.; HAN, Z.; ZHONG, W. ARNT-dependent CCR8 reprogrammed LDH isoform expression correlates with poor clinical outcomes of prostate cancer. *Molecular Carcinogenesis*, p.1-11, 2020.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. *The breast*, v.13, p.356-384, 1998.
- HADDEN, A.G.; COTTER, S.M.; RAND, W.; MOORE, A.S.; DAVIS, R.M.; MORRISSEY, P. Efficacy and toxicosis of VELCAP-C treatment of lymphoma in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, p.153-157, 2008.
- HSU, P.P.; SABATINI, D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, v.5, n.134, p.703-707, 2008.
- HUANG, X.; LI, X.; XIE, X. High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer. *Breast*, v.30, p.39-46, 2016.
- KOUKOURAKIS, M.; GIATROMANOLAKI, A.; SIVRIDIS, E. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumor hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer*, v.89, p.877-885, 2003.
- KOUKOURAKIS, M.I.; GIATROMANOLAKI, A.; SIVRIDIS, E.; GATTER, K.C.; HARRIS, A.L. Tumor Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway-a report of the tumor Angiogenesis Research Group. *Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.26, p.4301-4308, 2006.
- KOUKOURAKIS, M.I.; KONTOMANOLIS, E.; GIATROMANOLAKI, A.; SIVRIDIS, E.; LIBERIS, V. Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynecological cancer and benign diseases. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, v.67, n.3, p.162-168, 2009.
- MARCONATO, L.; CRISPINO, G.; FINOTELLO, R.; MAZZOTTI, S.; SALERNI, F.; ZINI, E. Serum lactate dehydrogenase activity in canine malignancies. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.7, n.4, p.236-243, 2009.
- ZHAO, D.; ZOU, S.W.; LIU, Y.; ZHOU, X.; MO, Y.; WANG, P.; GUAN, K.L. Lysine-5 Acetylation Negatively Regulates Lactate Dehydrogenase A and Is Decreased in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, v.23, n.4, p.464-476, 2013.