



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

***Efeito Warburg* em gatos com linfoma**

**Carlos Henrique da Silva Vitorino
Coimbra, Julho 2019**



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Efeito *Warburg* em gatos com linfoma

Coimbra, Julho 2019

Carlos Henrique da Silva Vitorino

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Prof. Doutora Ana Calado Lopes

Arguente: Prof. Doutora Ana Cristina Silvestre Ferreira

Orientador: Prof. Doutora Ana Catarina Figueira

Orientador Interno

Professora Doutora Ana Catarina Figueira

Coorientadores Internos

Mestre Hugo Vilhena

Doutor Damián Tortosa (Universidade de
Murcia)

Orientador Externo

Mestre Luís Montenegro (HRVM)

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina
Veterinária da Escola Universitária Vasco da Gama

Agradecimentos

Como forma de reconhecimento na elaboração deste trabalho conjunto, agradeço à Dr.^a Ana Catarina Figueira, como Orientadora Interna, pela disponibilidade e orientação fornecida para a realização deste trabalho e por reconhecer a importância deste trabalho. Agradecer ao Dr. Hugo Vilhena, como coorientador, pelo desafio que me propôs, pela orientação e ajuda disponibilizada na recolha e tratamento da informação das amostras e elaboração deste artigo de investigação. Agradecer ao Dr. Damián, pela ajuda e contributo à dissertação. Agradecimento ao Dr. Luís Montenegro, por aceitar a minha proposta de realização de estágio curricular no Hospital Referência Veterinária Montenegro (HRVM), pela confiança, apoio e incentivo demonstrados durante o período de realização do estágio curricular. Um agradecimento geral à grande equipa que compõe o corpo clínico do HRVM pelo apoio, cooperação, integração e formação prestada. Agradeço aos restantes elementos recém-formados, e equipa de estagiários fantásticos que estiveram presentes e contribuíram para um bom ambiente social e profissional.

Um agradecimento às várias entidades onde realizei estágios intercalares, em especial à Clínica Veterinária Monvet em Coimbra, ao Dr. Hermano Pina e elementos do corpo clínico.

Agradeço à Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG) e aos docentes que a compõem, pela amizade e formação prestada, que continuam a inovar e marcar pela diferença por proporcionar aos seus formandos proximidade ao contexto real de trabalho da atividade Médico Veterinária. Agradeço aos funcionários da EUVG, com carinho especial ao Sr. Amaral, D.^a Paula Amaral, D.^a Florinda, D.^a Emília, também à Dr.^a Mafalda Leal pela ajuda e atenção para com a minha família, à Sandra Silva tanto pela orientação nesta fase final, como desde o início, pela sua alegria, simpatia, pela ajuda, pelo seu excelente trabalho que todos valorizamos.

Agradecer a todos os colegas de curso que tive o prazer de conhecer, principalmente à turma de 2013. Um agradecimento em particular à minha madrinha de curso, Nádia Varandas, e às minhas afilhadas, Maria João Lérias, Juliana Cruz e Joana Carrapiço, e aos restantes colegas, André João Marcos, Anthony Leal, Diana Oliveira, Diana Silva, Dária Isabel de Farias, João Pedro Miranda, Joana Meneses, Joana Rodrigues, Maria Martins, Marta Monteiro, Ricardo Ramos e aos demais, também pelos bons momentos sociais, momentos de estudo, pela força e encorajamento para superar os desafios e exigências da nossa área.

Agradecimento intemporal aos meus Pais (José Carlos e Ana Paula Vitorino) e familiares que de forma mais ou menos próxima acompanham o meu percurso de vida e académico, pelo encorajamento, felicitação pelas minhas conquistas, palavras de conforto e segurança quando necessário.

Índice geral

Conteúdo

Agradecimentos	iv
Índice geral	v
Índice de figuras.	vi
Índice de tabelas.	vi
Lista de abreviaturas	vii
Resumo	2
Abstract	3
Introdução	4
Materiais e métodos	7
Resultados	10
Discussão	11
Conclusões.....	14
Referências Bibliográficas	15

Índice de figuras.

Figura 1: Diagramas de caixa das concentrações séricas de glicose, frutossamina, lactato e lactato desidrogenase dos gatos com linfoma e dos gatos do grupo controlo.	10
---	----

Índice de tabelas.

Tabela 1: Caracterização dos gatos com linfoma e gatos saudáveis incluídos no estudo.	8
Tabela 2: Concentrações séricas de glicose, frutossamina, Lactato e LDH (mediana e intervalo interquartis) nos gatos com linfoma e gatos do grupo controlo.	10

Lista de Abreviaturas

ATP – Adenosina Trifosfato

FeLV – Vírus da Leucemia Felina (do inglês *Feline leukemia virus*)

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina (do inglês *Feline immunodeficiency vírus*)

HIF-1 – Factor Indutor de Hipóxia 1 (do inglês *Hypoxia Inducible Factor 1*)

IPI – Índice de Prognóstico Internacional

LDH – Lactato desidrogenase

LDHA – Lactato desidrogenase, isoforma A

mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês *Mammalian target of rapamycin*)

NAD – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NADH – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzida (do inglês *Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

Efeito Warburg em gatos com linfoma

Carlos Vitorino ^a, Hugo Vilhena ^{a b c}, Damián Tortosa ^d, Luís Montenegro ^e, Ana Catarina Figueira ^{a f}

^a Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG) / Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal.
carloshsvitorino@hotmail.com
hcrvilhena@hotmail.com
acfigueira@gmail.com

^b Hospital Veterinário do Baixo Vouga (HVBV), Estrada Nacional 1, 355, Segadães, 3750-742 Águeda, Portugal.

^c Centro de Investigação em Ciência Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, Apartado 1013, 5001-801, Vila Real, Portugal.

^d Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas Interlab-UMU, Universidade de Múrcia, Campus de Espinardo Ed.16, 30100 Espinardo, Múrcia, Espanha.
det20165@um.es

^e Hospital Referência Veterinária Montenegro (HRVM), Rua da Póvoa, 34, 4000–395 Porto, Portugal.
referenciahospvetmontenegro@gmail.com

^f Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC), Av. José R. Sousa Fernandes, 197, 3020-210 Coimbra, Portugal.

Resumo

A glicose é o principal substrato energético das células saudáveis do organismo. Nestas células, a via principal de metabolização da glicose é a fosforilação oxidativa, processo que garante um rendimento energético final de até 38 moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de glicose consumida. No entanto, as células tumorais não seguem o mesmo modelo, e utilizam a via da glicólise aeróbia, ou efeito *Warburg*, como via metabólica preferencial no metabolismo da glicose, mesmo em condições de normoxemia e ausência de lesão mitocondrial. A glicólise aeróbia é uma via menos eficiente mas mais rápida na obtenção de energia do que a fosforilação oxidativa, resultando num aumento das concentrações de lactato e de outros compostos metabólicos, que são importantes para a carcinogénese, proporciona alterações no microambiente tumoral que favorecem a proliferação tumoral, e é também importante nas vias de sinalização celular das células tumorais.

O efeito *Warburg* está descrito em diferentes tumores sólidos e hematopoiéticos em medicina humana, inclusive em linfomas. No entanto, a informação relativa ao efeito *Warburg* em oncologia veterinária é escassa. Os linfomas são dos tumores malignos mais frequentes em felinos, representando aproximadamente 30% de todos os tumores e 90% das neoplasias hematopoiéticas diagnosticadas em gatos. Que tenhamos conhecimento, o efeito *Warburg* não está estudado neste tumor. O principal objetivo deste estudo consistiu em estudar o efeito *Warburg* em gatos com linfoma.

No presente estudo foram incluídos 37 gatos, dos quais 27 gatos com linfoma e 10 animais saudáveis usados como grupo controlo. As concentrações séricas de glicose, frutamina, lactato e lactato desidrogenase (LDH) foram determinadas em todos os animais incluídos no estudo, em amostras recolhidas no momento do diagnóstico e antes da instituição de qualquer tratamento. Os gatos com linfoma apresentaram valores séricos de lactato significativamente superiores aos gatos do grupo controlo ($P < 0.001$). Para além disso, apesar das diferenças não serem significativas, foi observada uma tendência para os valores de LDH serem superiores nos gatos doentes do que nos gatos do grupo controlo ($P = 0.059$). Não foram observadas diferenças significativas na concentração de glicose e frutamina entre os gatos com linfoma e os gatos saudáveis ($P = 0.294$ e 0.264 , respetivamente).

Os resultados obtidos no nosso estudo sugerem que o efeito *Warburg* poderá estar implicado na carcinogénese do linfoma felino, uma vez que foram observados aumentos significativos na concentração de lactato nos gatos doentes em relação aos gatos saudáveis, e também uma tendência de aumento da concentração de LDH nos gatos doentes. Estes resultados também sugerem que o lactato e a LDH poderão ser biomarcadores do linfoma felino. Estudos futuros são necessários para avaliar as variações destes biomarcadores em função das diferentes características do tumor, e avaliar as alterações do metabolismo da glicose como alvo terapêutico do linfoma felino.

Palavras-chave: *Warburg*, Felino, Glicose, Frutamina, Lactato, Lactato desidrogenase, Linfoma

Abstract

Glucose is the main energetic substrate of the normal cells. In these cells, the principal metabolic pathway of glucose metabolism is the oxidative phosphorylation, a process that guarantees a final energy efficiency of up to 38 molecules of adenosine triphosphate (ATP) per molecule of glucose consumed. However, tumor cells follow a different model, and use the aerobic glycolysis pathway, or Warburg effect, as the preferred metabolic pathway of glucose metabolism, even under normoxemia and absence of mitochondrial lesion. Aerobic glycolysis is less efficient but a faster pathway to obtain energy than the oxidative phosphorylation, resulting in an increase in lactate concentrations and other metabolic compounds, which are important for carcinogenesis, provides changes in the tumor microenvironment that favor tumor proliferation, and is also important in the cell signaling pathways of tumor cells.

The Warburg effect was described in different solid and hematopoietic tumors in human medicine, including lymphomas. However, information regarding the Warburg effect in veterinary oncology is scarce. Lymphomas are among the most frequent malignant tumors in felines, accounting for approximately 30% of all tumors and 90% of the hematopoietic neoplasms diagnosed in cats. To our best knowledge, the Warburg effect was not evaluated in this tumor. Thus, the main objective of this study was to study the Warburg effect in cats with lymphoma.

Thirty seven cats were enrolled in the study, including 27 cats with lymphoma and 10 healthy control animals. Serum concentrations of glucose, fructosamine, lactate and lactate dehydrogenase (LDH) were determined in serum samples of all animals enrolled in the study, collected at the time of diagnosis and prior to the institution of any treatment. Cats with lymphoma presented significantly higher serum concentrations of lactate than control cats ($P < 0.001$). In addition, although the difference was not significant, a tendency to increase was also observed for LDH in diseased cats when compared with control animals ($P = 0.059$). There were no significant differences in glucose and fructosamine concentrations between cats with lymphoma and healthy cats ($P = 0.294$ and 0.264 , respectively).

The results obtained in our study suggest that the Warburg effect might be implicated in carcinogenesis of feline lymphoma, since significant increases in serum lactate were observed in diseased cats in relation to healthy cats, and a tendency to increase in LDH concentrations was also observed in diseased cats. These results also suggest that lactate and LDH might be clinically useful biomarkers of feline lymphoma. However, future studies are needed to evaluate the influence of different tumor features in concentrations of these biomarkers. In addition, future studies should also assess changes in glucose metabolism as a therapeutic target for feline lymphoma.

Key words: Warburg, Feline, Glucose, Fructosamine, Lactate, Lactate dehydrogenase, Lymphoma

Introdução

O linfoma é um dos tumores mais frequentes em felinos, representa aproximadamente 30% de todos os tumores (Gustafson, Villamil, Taylor, & Flory, 2014) e 90% das neoplasias hematopoiéticas diagnosticadas em gatos (Richter, 2003; Wilson, 2008). Apresenta uma maior prevalência em gatos jovens com idade inferior a quatro anos de idade e em gatos geriátricos a partir dos oito anos de idade (Gustafson et al., 2014). Os linfomas felinos podem apresentar várias localizações anatômicas, sendo classificados como: alimentar, mediastínico ou torácico, nodal e extranodal (Ettinger, 2003). A infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) é considerada uma etiologia importante do linfoma, sendo que anteriormente, mais de 70% dos gatos com linfoma eram FeLV positivos, principalmente animais jovens que apresentavam linfoma do tipo mediastínico (Louwerens, London, Pedersen, & Lyons, 2005). Atualmente, a diminuição da prevalência de infecção por FeLV devido à implementação de protocolos de vacinação fez com que diminuísse o número de casos de linfoma em animais jovens, mas por outro lado observou-se um aumento da frequência de linfomas do tipo alimentar em gatos geriátricos (Vail, Moore, Ogilvie, Volk, & Samples, 1998; Wilson, 2008; Withrow, Vail, & Page, 2013).

Apesar do linfoma felino ser um tumor que de uma forma geral apresenta uma resposta inicial favorável à quimioterapia (Barrs & Beatty, 2012; Ettinger, 2003), apresenta um prognóstico reservado, com um tempo de sobrevida após o diagnóstico muito variável e dependente de diversos fatores (Barrs & Beatty, 2012; Vail et al., 1998). Assim, a descoberta de biomarcadores da doença poderão ser úteis no diagnóstico, na monitorização da evolução da doença, na monitorização da resposta ao tratamento e como indicadores de prognóstico. Para além disso, a descoberta de vias metabólicas envolvidas na carcinogénese são importantes para a compreensão da evolução do tumor, e poderão ser úteis como alvos terapêuticos das neoplasias (Morais-Santos et al., 2015).

A glicose é a principal fonte de energia e de carbono dos processos metabólicos das células saudáveis do organismo (Lu, Tan, & Cai, 2015). Ao entrar para a célula, a glicose é convertida em piruvato seguindo para a mitocôndria, realiza a fosforilação oxidativa com o intuito de obter um rendimento energético final de até 38 moléculas de ATP por molécula de glicose consumida (Bose & Le, 2018; Lu et al., 2015). As células tumorais não seguem o mesmo modelo, e em 1924 Otto Warburg observou um fenómeno peculiar sobre o seu metabolismo (Bose & Le, 2018; Lunt & Heiden, 2011). A glicólise aeróbia ou efeito de *Warburg* é a via metabólica preferencial das células tumorais (Luc, Tortorella, Ververis, & Karagiannis, 2015). Estas metabolizam glicose em lactato sob condições normais de oxigenação (Gallo et al., 2015; Luc et al., 2015; Levine & Puzio-kuter, 2010; Lunt & Heiden, 2011), e sem correlação com dano mitocondrial (Luc et al., 2015), obtendo um retorno energético de dois ATPs por molécula de glicose consumida (Gallo et al., 2015; Luc et al., 2015), bem como outros produtos essenciais à síntese de macromoléculas (Luc et al., 2015). Apesar da glicólise aeróbia ser uma via de obtenção de energia menos eficiente do que a fosforilação oxidativa, é no entanto uma via mais rápida, onde a obtenção de lactato a partir da glicose ocorre a uma taxa 10 a 100 vezes superior à oxidação mitocondrial da glicose (Bose & Le, 2018; Liberti & Locasale, 2016; Gallo et al., 2015; Lu et al., 2015;

Luc et al., 2015). Para além disso, o efeito *Warburg* tem sido descrito como um mecanismo de suporte da síntese de moléculas necessárias à proliferação celular das células tumorais, no qual o aumento do consumo de glicose funciona como fonte de carbono que é usado na síntese de nucleótidos, lípidos e proteínas fundamentais na oncogénese (Liberti & Locasale, 2016; Boroughs & Deberardinis, 2015; Deberardinis, Lum, Hatzivassiliou, & Thompson, 2008). O efeito *Warburg* tem estado ainda implicado na sinalização celular das células tumorais e na criação de condições no microambiente tumoral que favorecem a progressão tumoral (Liberti & Locasale, 2016).

A glicose é um dos nutrientes mais acessíveis às células tumorais (Sun, Suo, Li, Zhang, & Gao, 2018). O aumento da sua captação por estas células foi descrito inicialmente por Otto Warburg (Ferreira, 2010), e atribuída à elevada atividade glicolítica das células tumorais (San-millán & Brooks, 2017). A reprogramação metabólica subjacente ao efeito *Warburg* deve-se à ação de vários oncogenes e genes supressores tumorais (Bose & Le, 2018; Hay, 2016; Lu et al., 2015; Walenta & Mueller-klieser, 2004), que desempenham um papel importante na alteração para a glicólise aeróbia (Ngo, Ververis, Tortorella, & Karagiannis, 2015; Walenta & Mueller-klieser, 2004), que origina uma elevada conversão de glicose em piruvato (Lu et al., 2015), e posteriormente, pela ação da LDH, ocorrem elevadas taxas de conversão de piruvato em lactato (Dang, 2010; Lu et al., 2015; Luc et al., 2015; Terragni, Morselli-labate, Vignoli, & Bottero, 2016). Este passo é essencial para a regeneração do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺) no citoplasma, para que prevaleçam elevadas taxas de glicólise, necessárias à oncogénese (Koukourakis & Giatromanolaki, 2019; Li, Zhang, Zhao, Ma, & Chen, 2016; Yu, Chen, Wang, & Chen, 2016).

Nas células tumorais, a LDH é normalmente induzida por oncoproteínas como a cMyc, o fator indutor de hipoxia 1 (HIF-1) e a cinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), e é responsável pela redução do piruvato (que é o produto final da glicólise) a lactato, enquanto simultaneamente oxida o dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida (NADH) a NAD⁺ (Sun et al., 2018). A isoforma A da LDH (LDHA) apresenta elevada afinidade pelo piruvato e uma elevada eficiência na conversão de piruvato em lactato, e é a isoenzima da LDH predominantemente expressa pelos tumores (Hay, 2016; Gallo et al., 2015; Augoff, Hryniewicz-jankowska, & Tabola, 2014; Doherty & Cleveland, 2013).

O lactato, como produto final do efeito *Warburg*, está envolvido na proliferação descontrolada de células e nos processos de carcinogénese (Sun et al., 2018; Luc et al., 2015), observando-se um aumento dos níveis de lactato até 40 vezes superiores em relação aos seus valores basais nos tumores com elevada atividade glicolítica (San-millán & Brooks, 2017). O lactato produzido é transportado para o espaço extracelular através de transportadores ao nível da membrana plasmática (Luc et al., 2015), fazendo com que o metabolismo glicolítico se mantenha ativo (Levine & Puzio-kuter, 2010).

O efeito *Warburg* foi descrito em diversos tumores sólidos e hematopoiéticos em medicina humana (Brault et al., 2018). No entanto, o efeito *Warburg* está pouco estudado em oncologia

veterinária clínica. Assim, este estudo teve como objetivo principal estudar o efeito *Warburg* em gatos com linfoma, através da determinação da concentração sérica de glucose, frutossamina, lactato e LDH.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Concelho Científico da Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Coimbra, Portugal

Animais e Amostras Séricas

No presente estudo foram incluídos 37 gatos que foram apresentados à consulta em dois centros de atendimento médico-veterinários de Portugal (Hospital Veterinário do Baixo Vouga e Hospital Veterinário Universitário de Coimbra) entre Janeiro de 2015 e Março de 2019. Destes, 27 animais apresentavam linfoma, diagnosticado através de citologia e / ou histopatologia, e 10 gatos eram saudáveis e constituíram o grupo controlo. Gatos que apresentavam, no momento do diagnóstico, doenças concomitantes, outros tumores benignos ou malignos ou história de neoplasia prévia foram excluídos do estudo. Gatos que já se encontravam a fazer qualquer tratamento foram também excluídos do estudo, para eliminar a possível interferência dos fármacos na determinação da concentração sérica dos diferentes parâmetros analisados no momento do diagnóstico.

Em todos os animais doentes incluídos no estudo foi realizado, na admissão e também nas consultas de controlo quando clinicamente indicado e de acordo com o consentimento dos proprietários, exame de estado geral, hematologia, perfil bioquímico sanguíneo, avaliação dos linfonodos, radiologia torácica e ecografia abdominal, para avaliação do estado de saúde e para estadiamento clínico. Os dados referentes à identificação e os parâmetros clínicos avaliados incluíram a raça, género, estado reprodutivo (castrado ou não castrado), idade, peso, estado de infeção pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e / ou FeLV, localização anatómica do tumor (mediastínico, alimentar, nodal ou extranodal), grau histológico (alto ou baixo) e o estadio clínico (I a V). O estadio clínico foi determinado com base no Sistema de Estadiamento Clínico de Linfoma em Animais de Companhia da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Withrow et al., 2013) (Tabela 1).

Os 10 gatos do grupo controlo foram considerados clinicamente saudáveis com base na história clínica, exame físico e resultados de exames complementares de diagnóstico, e necessitaram de análises sanguíneas (hematologia e bioquímica sanguínea) como parte do protocolo pré-anestésico de procedimentos cirúrgicos eletivos, para realização de *check-ups* geriátricos ou para determinação do estado de infeção por FIV e FeLV (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização dos gatos com linfoma e gatos saudáveis incluídos no estudo.

	Gatos com Linfoma (n=27)	Gatos Grupo Controlo (n=10)
Raça		
Europeu Comum	26	8
Persa	1	2
Género		
Macho	13	1
Fêmea	14	9
Estado Reprodutivo		
Castrado	20	4
Não Castrado	6	6
Idade (anos)		
Média	7.5	2.7
Mínimo - Máximo	0.6 - 17.0	0.5 - 6.0
Peso (Kg)		
Média	4.0	3.3
Mínimo - Máximo	2.3 - 6.7	2.2 - 4.1
Infeção por FIV / FeLV		
Positivo FeLV	8	0
Positivo FIV	2	0
Negativo FIV e FeLV	4	10
Não determinado	13	0
Localização Anatómica		
Mediastínico	12	-
Alimentar	7	-
Nodal	1	-
Extranodal	3	-
Duas localizações	3	-
Grau Histológico		
Alto grau	23	-
Baixo Grau	3	-
Estadio Clínico[#]		
Estadio I	9	-
Estadio II	10	-
Estadio III	2	-
Estadio IV	1	-
Estadio V	0	-

A determinação do estadio clínico não foi determinada nos animais com linfoma de baixo grau; num dos gatos com linfoma não foi possível recolher informação relativa à localização anatómica do tumor, grau histológico do tumor e estadio clínico.

A amostra de sangue de cada animal incluído no estudo (n=37) foi recolhida no momento do diagnóstico e dividida em duas partes: uma amostra de sangue total em tubo de EDTA (tubos K3EDTA, Aquisel, Barcelona, Espanha) para hematologia e outra em tubo sem anticoagulante (Vacuette Z com ativador de coágulo sanguíneo, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Áustria) para bioquímica sérica. Os tubos sem anticoagulante foram deixados em repouso durante cerca de 15 minutos após a colheita, à temperatura ambiente, para formação do coágulo sanguíneo. Posteriormente, foram centrifugados (10 min, 2000 x g) e o soro sobrenadante foi usado para as análises bioquímicas. As amostras de soro remanescentes foram armazenadas a -20 ° C. A determinação das concentrações séricas de glicose, frutossamina, lactato e LDH foi realizada nas amostras de soro remanescentes que foram colhidas para as análises clínicas; nenhuma amostra de sangue foi colhida exclusivamente para este estudo.

Determinação da concentração sérica de Glicose, Frutossamina, Lactato e Lactato Desidrogenase

As amostras foram enviadas para o Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas da Universidade de Múrcia (Interlab-UMU) em Espanha, em condições de congelação. A determinação da concentração sérica de glicose, frutossamina, lactato e LDH foi realizada em todos os animais (n=37).

As concentrações séricas de glicose e lactato foram determinadas usando *kits* comerciais (reagente de glicose OSR6121 e reagente de lactato OSR6193, respetivamente, *Beckman Coulter*, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações séricas de LDH e frutossamina foram também determinadas recorrendo a *kits* comerciais (Lactato Dehidrogenasa (LDH) Ref 11581 e Frutossamina Ref 11046, respetivamente, *BioSystems SA*, Barcelona, Espanha) seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas num aparelho bioquímico automatizado (Analisador Químico Automático Olympus AU600, Olympus Europe GmbH, Hamburgo, Alemanha).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do *software Graphpad Prism* versão 6 (La Jolla, Califórnia, EUA). As alterações nas variáveis entre grupos foram avaliadas pelo teste *Mann-Whitney* não paramétrico não pareado. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

Resultados

Os gatos com linfoma apresentaram valores séricos de lactato significativamente superiores aos gatos do grupo controlo ($P < 0.001$). Para além disso, apesar de as diferenças não serem significativas, foi observada uma tendência para os valores de LDH serem superiores nos gatos doentes do que nos gatos do grupo controlo ($P = 0.059$). Não foram observadas diferenças significativas na concentração de glicose e frutossamina entre os gatos com linfoma e os gatos saudáveis ($P > 0.05$). As concentrações séricas de glicose, frutossamina, lactato e LDH dos gatos com linfoma e gatos saudáveis são apresentados na Tabela 2 e Figura 1.

Tabela 2: Concentrações séricas de glicose, frutossamina, Lactato e LDH (mediana e intervalo interquartis) nos gatos com linfoma e gatos do grupo controlo.

	Grupo linfoma felino	Grupo controlo	P
Glicose (mg/dL)	94.3 (69.7 – 135.1)	84.55 (71.45 – 133.1)	0.294
Frutossamina ($\mu\text{mol/L}$)	242 (203 - 282)	240 (197 - 262)	0.264
Lactato (mmol/L)	3.74 (2.55 – 6.72)	1.845(1.47 – 2.588)	<0.001
LDH (U/L)	306.7 (181.9 – 626.3)	183.2 (145.1 – 402.4)	0.059

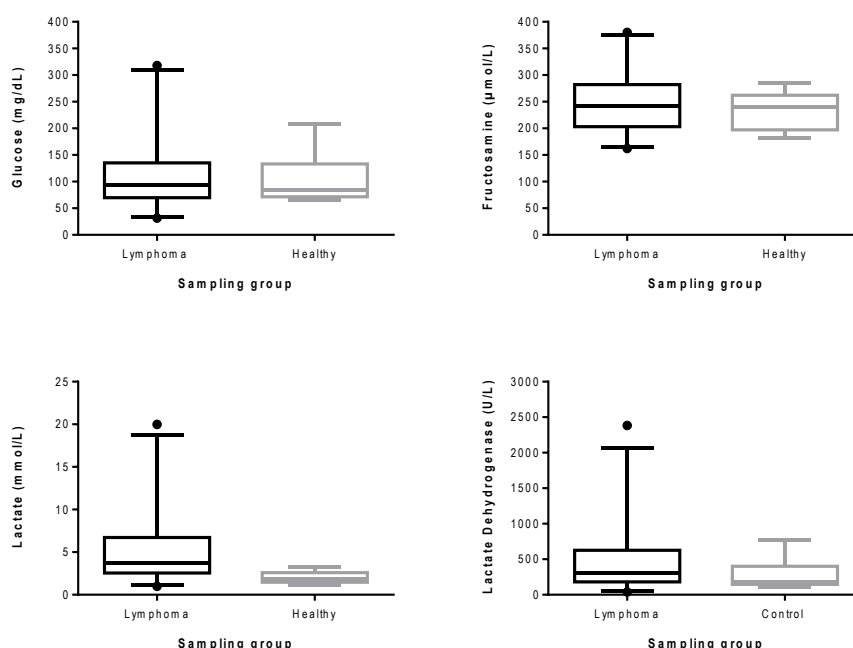


Figura 1: Diagramas de caixa das concentrações séricas de glicose, frutossamina, lactato e lactato desidrogenase dos gatos com linfoma e dos gatos do grupo controlo.

Em cada diagrama está representada a mediana (linha no interior da caixa), os percentis 25% e 75% (caixa), os percentis 5% e 95% (fios de bigodes) e os valores discrepantes (pontos).

Discussão

Que tenhamos conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar as alterações metabólicas decorrentes do efeito *Warburg* no linfoma felino. Neste estudo, a avaliação das alterações metabólicas associadas à glicólise aeróbia realizada pelas células tumorais foi avaliada através um painel bioquímico que incluiu a determinação das concentrações séricas de glicose, frutamina, lactato e LDH em gatos com diferentes apresentações de linfoma. O aumento das concentrações séricas de lactato e LDH detetados no grupo de animais doentes sugerem que a glicólise aeróbia pode estar implicada na carcinogénese do linfoma felino. Para além deste facto, estes resultados sugerem também que o lactato e a LDH poderão ser biomarcadores clinicamente úteis no diagnóstico, monitorização da evolução da doença e da resposta ao tratamento, e de prognóstico do linfoma felino; e que as alterações do metabolismo da glicose poderão ser alvos terapêuticos do linfoma felino.

O lactato resultante da glicólise é essencial para todos os principais passos da carcinogénese (San-millán & Brooks, 2017; Luc et al., 2015), e é também uma importante molécula de sinalização das células tumorais (Potter, Newport, & Morten, 2016). O aumento da atividade glicolítica nas células tumorais é responsável pela conversão de aproximadamente 66% da glicose captada em lactato (San-millán & Brooks, 2017; Luc et al., 2015). Os níveis elevados de lactato estão associados a um pior prognóstico em alguns tipos de neoplasias em medicina humana (San-millán & Brooks, 2017; Draoui & Feron, 2011), nomeadamente com uma maior agressividade tumoral, com um menor tempo de sobrevivência e com uma elevada incidência de metástases à distância em estadios iniciais dos tumores (San-millán & Brooks, 2017). Devido a estes fatores, o lactato é considerado um parâmetro adequado como indicador de diagnóstico e prognóstico de diferentes tumores (Dhup, Dadhich, Porporato, & Sonveaux, 2012). Em medicina humana, a hiperlactatémia é frequentemente associada a tumores hematopoiéticos tais como linfomas, leucemias e mieloma múltiplo, mas também a tumores sólidos com elevada atividade mitótica como por exemplo o carcinoma pulmonar de células pequenas (Touret, Boysen, & Nadeau, 2012).

Os resultados descritos relativos à ocorrência de hiperlactatémia em cães com linfoma são contraditórios (Vail et al., 1990). Tal como observado no nosso estudo em gatos com linfoma, um aumento significativo da concentração sérica de lactato foi descrito em cães com linfoma por Vail et al. (1990); no entanto, Touret et al. (2012) não detetaram uma hiperlactatémia clinicamente relevante em cães afetados pela doença, considerando que esta possa ser significativa em menos de 10% dos cães com linfoma.

A LDH intervém no último passo da glicólise (Terragni et al., 2016), e em conjunto com oncoproteínas tumorais é responsável pela síntese de elevadas quantidades de lactato mesmo em condições de aerobiose (Gillies et al., 2008). A LDH é também considerada um biomarcador de lesão e morte celular, que é libertada para a corrente sanguínea como consequência da destruição celular causada por diferentes doenças tumorais e não tumorais, tais como anemia hemolítica, enfarte de

miocárdio, embolismo pulmonar, rabdomiólise, linfoma, leucemia e tumores de células germinativas (Kostakis et al., 2018). Em humanos, o aumento dos níveis séricos de LDH em doenças neoplásicas tem sido associado, entre outras causas, à destruição de tecido causado pelo crescimento tumoral (Gallo et al., 2015).

Para além do aumento da LDH associado à destruição celular, as células tumorais expressam também elevadas quantidades desta enzima, especialmente da sua isoforma A (LDHA) (Bose & Le, 2018; Doherty & Cleveland, 2013; Draoui & Feron, 2011; Shim et al., 1997), tal como descrito em diferentes tumores em medicina humana, tais como o carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, carcinoma colorretal e carcinoma de pulmão de células não pequenas (Bose & Le, 2018). Nos tumores hematopoiéticos, verificou-se o aumento da LDH no soro de doentes com linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo (Augoff et al., 2014), sendo que no Índice de Prognóstico Internacional (IPI) é considerado como um forte preditor de sobrevivência em doentes com tumores linfóides agressivos (Augoff et al., 2014). É também referido em vários estudos retrospectivos como um biomarcador importante de prognóstico em diferentes tipos de carcinomas (Augoff et al., 2014).

A importância clínica da LDH no linfoma foi também avaliada em oncologia veterinária (Terragni et al., 2016). Um aumento da sua concentração sérica foi descrito em aproximadamente 60% dos gatos com linfoma alimentar (Terragni et al., 2016). Para além disso, o aumento da sua concentração sérica foi também descrita como um fator de mau prognóstico no linfoma felino (Terragni et al., 2016; Barrs & Beatty, 2012), mas não no linfoma canino (Zandvliet, 2016). No nosso estudo, apesar de ter sido detetada uma tendência para o aumento da concentração sérica de LDH em gatos com linfoma, a diferença em relação aos gatos controlo não foi significativa. No entanto, nesta investigação foram avaliados animais com apresentações heterogéneas de linfoma, nomeadamente com doença em diferentes localizações anatómicas, em diferentes estadios clínicos e diferentes graus histopatológicos. Assim, estudos futuros deverão avaliar se as alterações na expressão da LDH estão relacionadas com diferentes características da doença.

A glicose e a glutamina são as principais fontes nutricionais para as células neoplásicas, fundamentais para a sua sobrevivência e proliferação (Dang, 2012; Sun et al., 2018). Otto Warburg descreveu um aumento dos níveis de captação de glicose pelas células tumorais (47-70%) em relação às células saudáveis do organismo (2-18%), fundamental para garantir um aporte contínuo deste substrato energético às células em proliferação (San-millán & Brooks, 2017). Apesar de a glicólise não ser a principal via metabólica de síntese de ATP na maioria das células tumorais, contribui em média cerca de 17% para obtenção da sua energia (Lunt & Heiden, 2011), o que é suficiente para garantir a rápida proliferação (Li et al., 2016).

Em medicina humana, o aumento dos níveis séricos de glicose é também referido como um fator de risco de desenvolvimento de tumores, incluindo tumores de pâncreas (Beer & Liebenberg, 2014; Jee et al., 2015; Stattin et al., 2007), fígado (Beer & Liebenberg, 2014; Jee et al., 2015), rim (Jee

et al., 2015), do trato urinário, melanoma (Stattin et al., 2007), cancro colorretal, carcinoma gástrico (Beer & Liebenberg, 2014) e carcinoma mamário (Beer & Liebenberg, 2014; Stattin et al., 2007). Para além disso, a hiperglicémia agrava o estado clínico do doente, piorando o prognóstico dos pacientes com cancro (Barua et al., 2018). Ao contrário do descrito em relação à glicose, existe pouca correlação entre os níveis séricos de frutossamina e o risco de desenvolvimento de cancro em medicina humana. No entanto, em humanos, o risco de desenvolvimento de alguns tipos de cancro, tais como cancro da próstata, colorretal e pulmão, aparenta ser maior quando existe aumento das concentrações séricas de glicose e diminuição das concentrações de frutossamina (Wigertz, Carroll, Lambe, & Hammar, 2013).

Em medicina veterinária, principalmente em gatos, é comum o aumento transitório das concentrações de glicose sanguínea em animais doentes ou submetidos a stresse, tal como acontece quando são submetidos a algum procedimento clínico (Rand, Kinnaird, Baglioni, Blackshaw, & Priest, 2002). Devido a este facto, as determinações séricas de glicose poderão originar valores transitoriamente aumentadas (Rand et al., 2002). A frutossamina permite avaliar os níveis de glicose nos 10 a 14 dias que antecederam a recolha da amostra, sendo um indicador estável a curto-prazo do estado glicémico (Wigertz et al., 2013). Assim, no presente estudo, a avaliação das alterações no metabolismo da glicose em gatos com linfoma foi realizada através da determinação das concentrações séricas de glicose e de frutossamina. No entanto, no presente estudo, não foram detetadas alterações nas concentrações séricas destes parâmetros em gatos. Estudos futuros deverão avaliar se determinadas apresentações clínicas do linfoma felino poderão estar associadas a alterações significativas das concentrações séricas de glicose e frutossamina.

Conclusões

Os resultados obtidos no nosso estudo sugerem que as alterações da reprogramação metabólica causada pela glicólise aeróbia possa estar implicada na carcinogénese do linfoma felino, uma vez que foram observados aumentos significativos na concentração de lactato nos gatos doentes em relação aos gatos saudáveis, e também uma tendência de aumento na concentração de LDH nos gatos doentes. Estes resultados sugerem também que o lactato e a LDH poderão ser biomarcadores de diagnóstico, monitorização da evolução da doença e da resposta ao tratamento, e de prognóstico do linfoma felino. No entanto, são necessários estudos futuros para avaliar as variações destes biomarcadores em função das diferentes características do tumor. Para além disso, estudos futuros deverão também avaliar as alterações do metabolismo da glicose como alvo terapêutico do linfoma felino.

Referências Bibliográficas

- Augoff, K., Hryniewicz-jankowska, A., & Tabola, R. (2014). Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Letters*, 358(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.035>
- Barrs, V., & Beatty, J. (2012). Feline Alimentary Lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(3), 191–201. <https://doi.org/10.1177/1098612X12439266>
- Barua, R., Templeton, A. J., Seruga, B., Ocana, A., Amir, E., & Ethier, J. (2018). Hyperglycaemia and Survival in Solid Tumours: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Oncology*, 30(4), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2018.01.003>
- Beer, J. C. De, & Liebenberg, L. (2014). Does cancer risk increase with HbA 1c , independent of diabetes ? *British Journal of Cancer*, 110(9), 2361–2368. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.150>
- Boroughs, L. K., & Deberardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Publishing Group*, 17(4), 351–359. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>
- Bose, S., & Le, A. (2018). Glucose Metabolism in Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1063, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_1
- Brault, C., Zerbib, Y., Delette, C., Marc, J., Gruson, B., Marolleau, J. P., & Maizel, J. (2018). The Warburg Effect as a Type B Lactic Acidosis in a Patient With Acute Myeloid Leukemia: A Diagnostic Challenge for Clinicians. *Frontiers in Oncology*, 8(June), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00232>
- Dang, C. V. (2010). Rethinking the Warburg Effect with Myc Micromanaging Glutamine Metabolism. *Cancer Research*, 70(3), 859–862. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3556>
- Dang, C. V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes & Development*, 26(9), 877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>
- Deberardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer : Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- Dhup, S., Dadhich, R. K., Porporato, P. E., & Sonveaux, P. (2012). Multiple Biological Activities of Lactic Acid in Cancer: Influences on Tumor Growth , Angiogenesis and Metastasis. *Current Pharmaceutical Design*, 18(10), 1319–1330. <https://doi.org/10.2174/138161212799504902>
- Doherty, J. R., & Cleveland, J. L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3685–3692. <https://doi.org/10.1172/JCI69741.transcription>

- Draoui, N., & Feron, O. (2011). Lactate shuttles at a glance : from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease Model & Mechanisms*, 4(6), 727–732. <https://doi.org/10.1242/dmm.007724>
- Ettinger, S. N. (2003). Principles of Treatment for Feline Lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 98–102. <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36623>
- Ferreira, L. M. R. (2010). Cancer metabolism : The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology*, 89(3), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.08.006>
- Gallo, M., Sapio, L., Spina, A., Naviglio, D., Calogero, A., & Naviglio, S. (2015). Lactic dehydrogenase and cancer : an overview LDH and cancer. *Frontiers in Biocience*, 20(8), 1234–1249. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2741/4368>
- Gillies, R. J., Robey, I., Gatenby, R. A., Gillies, R. J., Robey, I., & Gatenby, R. A. (2008). Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers. *Jornal of Nuclear Medicine*, 49(2), 24–42. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.047258>
- Gustafson, T. L., Villamil, A., Taylor, B. E., & Flory, A. (2014). A Retrospective Study of Feline Gastric Lymphoma in 16 Chemotherapy-Treated Cats. *American Animal Hospital Association*, 50(1), 46–52. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5989>
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 635–649. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>. Reprogramming
- Jee, S. H., Ohrr, H., Sull, J., Yun, J., Ji, M., & Samet, J. (2015). Fasting Serum Glucose Level and Cancer Risk in Korean Men and Women. *JAMA*, 293(2), 194–202. <https://doi.org/10.1001/jama.293.2.194>
- Kostakis, I. D., Vaiopoulos, A. G., Garoufalia, Z., Papavassiliou, A. G., Kykalos, S., Kouraklis, G., & Tsourouflis, G. (2018). What can preoperative blood tests tell us about colorectal cancer ? *J BOUN*, 23(7), 84–95.
- Koukourakis, M. I., & Giatromanolaki, A. (2019). *Warburg effect, Lactate Dehydrogenase and Radio/Chemo-therapy efficacy. International Journal of Radiation Biology* (Vol. 95). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1490041>
- Levine, A. J., & Puzio-kuter, A. M. (2010). The Control of the Metabolic Switch. *Science*, 330(6009), 1340–1344. <https://doi.org/10.1126/science.1193494>
- Li, C., Zhang, G., Zhao, L., Ma, Z., & Chen, H. (2016). Metabolic reprogramming in cancer cells : glycolysis , glutaminolysis , and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0769-9>

- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect : How Does it Bene fi t Cancer Cells ? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Louwerens, M., London, C. A., Pedersen, N. C., & Lyons, L. A. (2005). Feline Lymphoma in the Post–Feline Leukemia Virus Era, 19(3), 329–335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02703.x>
- Lu, J., Tan, M., & Cai, Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression : Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *CANCER LETTERS*, 356(2), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.001>
- Luc, R., Tortorella, S. M., Ververis, K., & Karagiannis, T. C. (2015). Lactate as an insidious metabolite due to the Warburg effect. *Molecular Biology Reports*, 42(4), 835–840. <https://doi.org/10.1007/s11033-015-3859-9>
- Lunt, S. Y., & Heiden, M. G. Vander. (2011). Aerobic Glycolysis : Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Morais-Santos, F., Granja, S., Miranda-Gonçalves, V., Moreira, A. H. J., Queirós, S., Vilaça, J. L., ... Pinheiro, C. (2015). Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth. *Oncotarget*, 6(22), 19177–19189. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3910>
- Ngo, D., Ververis, K., Tortorella, S. M., & Karagiannis, T. C. (2015). Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. *Molecular Biology Reports*, 42(4), 819–823. <https://doi.org/10.1007/s11033-015-3857-y>
- Potter, M., Newport, E., & Morten, K. J. (2016). The Warburg effect : 80 years on. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1499–1505. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>
- Rand, J. S., Kinnaird, E., Baglioni, A., Blackshaw, J., & Priest, J. (2002). Acute Stress Hyperglycemia in Cats Is Associated with Struggling and Increased Concentrations of Lactate and Norepinephrine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(2), 123–132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02343.x>
- Richter, K. P. (2003). Feline gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(5), 1083–1098. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00054-8)
- San-millán, I., & Brooks, G. A. (2017). Reexamining cancer metabolism : lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*, 38(2), 119–133. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw127>

- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C.-S., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., & Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A : Implications for tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6658–6663.
- Stattin, P., Björ, O., Ferrari, P., Lukanova, A., Lenner, P., Lindahl, B., ... Kaaks, R. (2007). Prospective Study of Hyperglycemia and Cancer Risk. *Diabetes Care*, 30(3), 561–567. <https://doi.org/10.2337/dc06-0922>
- Sun, L., Suo, C., Li, S., Zhang, H., & Gao, P. (2018). BBA - Reviews on Cancer Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment : Beyond the Warburg Effect. *Reviews on Cancer*, 1870(1), 51–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.06.005>
- Terragni, R., Morselli-labate, A. M., Vignoli, M., & Bottero, E. (2016). Is Serum Total LDH Evaluation Able to Differentiate between Alimentary Lymphoma and Inflammatory Bowel Disease in a Real World Clinical Setting ? *PLOS ONE*, 11(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151641>
- Touret, M., Boysen, S. R., & Nadeau, M. (2012). Retrospective evaluation of potential causes associated with clinically relevant hyperlactatemia in dogs with lymphoma. *The Canadian Veterinary Journal*, 53(5), 511–517.
- Vail, D. M., Moore, A. S., Ogilvie, G. K., Volk, L. M., & Samples, T. (1998). Feline Lymphoma (145 Cases): Proliferation Indices, Cluster of Differentiation 3 Immunoreactivity, and Their Association with Prognosis in 90 Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(5), 349–354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb02134.x>
- Vail, D. M., Ogilvie, G. K., Wheeler, S. L., Fettman, M. J., Johnston, S. D., & Hegstad, R. L. (1990). Alterations in Carbohydrate Metabolism in Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4(1), 8–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1990.tb00868.x>
- Walenta, S., & Mueller-klieser, W. F. (2004). Lactate : Mirror and Motor of Tumor Malignancy. *Seminars in Radiation Oncology*, 14(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2004.04.004>
- Wigertz, A., Carroll, P., Lambe, M., & Hammar, N. (2013). Serum Glucose and Fructosamine in Relation to Risk of Cancer. *PLOS ONE*, 8(1), e54944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054944>
- Wilson, H. M. (2008). Feline Alimentary Lymphoma : Demystifying the Enigma. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(4), 177–184. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.10.003>
- Withrow, S., Vail, D., & Page, R. (2013). *Small Animal Clinical Oncology* (5th editio). St. Louis, Missouri.
- Yu, L., Chen, X., Wang, L., & Chen, S. (2016). The sweet trap in tumors : aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*, 7(25), 38908–38926.

<https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.7676>

Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(2), 76–104.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1152633>