



MEDICINA INTERNA

PONENTES:



PACHI CLEMENTE. Licenciado en veterinaria por la Facultad de Cáceres en 1993. Entre 1993 y 2002 trabajó en clínica de pequeños animales en Valencia, y desde entonces dirige la clínica veterinaria La Merced en Calpe (Alicante) con su actividad clínica centrada en la oncología. Estancias en Ohio State University (2006 y 2008). Es autor de comunicaciones, artículos y varios capítulos de libros y ponente invitado en España como en el extranjero. Desde 2003 es profesor asociado y responsable del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Veterinario de la facultad de Valencia. Miembro de la Sociedad Europea de Oncología Veterinaria

JOSEP PASTOR, DVM, PhD, Dipl ECVCP. Se licenció en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona en 1989. Posteriormente en 1994 obtuvo el grado de doctor en Medicina Veterinaria por esta misma Universidad. Desde 1991 es profesor de Patología Médica y compagina su actividad docente con la asistencial en el Hospital Clínico Veterinario de la UAB. Desde 2002 es diplomado del colegio europeo de patología clínica (Dipl ECVCP). Sus áreas de interés clínicas son la hematología y la oncología de pequeños animales, donde a publicado numerosos artículos en revistas internacionales.



CONTENIDO:

- **Aproximación terapéutica en oncología, basada en casos clínicos:**
 - o Más allá en la especialidad de oncología: marcadores tumorales, inmunología en oncología, genética aplicada a la oncología

- **Aproximación terapéutica en procesos neoplásicos más comunes**
 - o Taller de Citología e Histopatología Oncológica

QUIMIOTERAPIA ANTIANGIOGÉNICA METRONÓMICA

Pachi Clemente Vicario
Clínica Veterinaria La Merced
Servicio Oncología Hospital Clínico Veterinario UCH CEU

La idea de que tratando la angiogénesis se puede controlar el crecimiento tumoral tiene 40 años. Judah Folkman propuso una hipótesis que defendía varios puntos que se han ido demostrando posteriormente: un tumor no puede crecer más de 3-4 mm si no es capaz de generar nuevos vasos sanguíneos que lo alimenten. Para que el tumor haga que esta angiogénesis comience, debe secretar alguna sustancia, que él llamó “factor de angiogénesis tumoral” y si se pudiera bloquear esta sustancia, se podría controlar el crecimiento del tumor. Por último, defendió que este tipo de tratamiento no llevaría a la cura completa, pero mantendría el tumor en volúmenes diminutos, convirtiendo así una enfermedad mortal, en crónica¹.

Han tenido que pasar los años y ocurrir una serie de descubrimientos, para que esta idea inicial se convierta en uno de los campos de investigación más activos en oncología actualmente, con multitud de fármacos “antiangiogénicos” en distintas fases de estudios clínicos en medicina humana o aprobados para el tratamiento de determinados tumores. El primer factor que se identificó fue el “factor de crecimiento de los fibroblastos” (FCF) seguido del “factor de crecimiento del endotelio vascular” (VEGF por sus siglas en inglés)². A partir de ahí, se describieron moléculas angiogénicas y antiangiogénicas, sus receptores y los mecanismos de acción, y se desarrollaron los métodos que permitían medir la actividad de unas y otras, es decir, medir la angiogénesis³. Con estas herramientas se pudo demostrar que a mayor nivel de angiogénesis, mayor agresividad tenía el tumor, lo que aumentó el interés en descubrir la forma de evitar la formación de nuevos vasos en el tumor. Es interesante ver que el proceso no es exclusivo de tumores sólidos, sino que afecta también a pacientes con tumores “líquidos” como leucemias o mieloma múltiple⁴. Estos pacientes muestran altos niveles de sustancias pro-angiogénesis en suero y orina, así como alta vascularización en la médula ósea, por lo que empezaron a estudiarse enfoques antiangiogénicos como parte de su tratamiento (p.e. talidomida en mieloma múltiple).

Durante años, se habían usado en oncología fármacos y terapias que ahora sabemos que afectaban no sólo a la célula tumoral, sino también a los nuevos vasos sanguíneos de forma “accidental”. Se trataba de encontrar las dosis o protocolos adecuados para optimizar este efecto antiangiogénesis y dos artículos publicados en los años 1999 y 2000, mostraron la eficacia del nuevo enfoque. Klement *et al.* demostraron cómo dosis bajas de fármacos citostáticos inhibían el crecimiento de las células endoteliales sin afectar a células tumorales⁵. Vieron también cómo la combinación de vinblastina en dosis bajas de forma continuada más un agente antiangiogénico (anticuerpo antiVEGF) inhibían, de forma prolongada en el tiempo, el crecimiento del tumor. Tanto la vinblastina como el anticuerpo disminuyeron el tamaño tumoral al ser usados de forma separada, pero rápidamente el tumor volvió a crecer, cosa que no ocurría al darlos de forma combinada. Por su parte, Browder *et al.* publicaron cómo el protocolo antiangiogénico con ciclofosfamida a dosis bajas de forma continua era eficaz para inhibir el crecimiento tumoral, independientemente de que el tumor fuera sensible o resistente a la ciclofosfamida⁶. Un tercer artículo publicado el mismo año, por Hanahan *et al.* denominó a estos protocolos como quimioterapia metronómica, nombre que se sigue usando hasta la fecha⁷.

También en el 2000, Masferrer publicó un artículo donde demostraba la influencia de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en la angiogénesis tumoral y cómo su inhibición podía controlar el crecimiento tumoral, lo que hizo que los inhibidores de COX-2 pasaran a formar parte de los protocolos antiangiogénicos a estudiar. Un dato interesante del este estudio es que la inhibición del crecimiento tumoral se observa de forma dependiente a la dosis, siendo mejor la respuesta cuando se incrementa la dosis (algo que no se observa en los estudios de fármacos citotóxicos como la ciclofosfamida). Cuando la dosis se disminuye por debajo de un umbral, deja de observarse respuesta al inhibidor de COX-2. Otro dato de este estudio es que compararon la actividad antiangiogénica (midiendo nuevos vasos sanguíneos en córnea de rata) de un

inhibidor COX-2, un inhibidor COX-1 y un inhibidor no selectivo (inhibe tanto COX-1 como COX-2). Mientras que el inhibidor de COX-1 no mostró ningún efecto, independientemente de la dosis usada, el inhibidor no selectivo mostró actividad antiangiogénica dosis-dependiente, pero para conseguir la máxima actividad antiangiogénica, las dosis resultaron tóxicas (por lesiones gastrointestinales y perforación con peritonitis). Sin embargo, el inhibidor selectivo de COX-2 estudiado, mostró alta actividad antiangiogénica a dosis terapéuticas sin efectos secundarios⁸.

La ciclofosfamida, a la dosis máxima tolerada, produce apoptosis de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del tumor, pero esto no produce el efecto antiangiogénico, probablemente porque estas células muertas, se reemplazan con células precursoras del endotelio (CPE), procedentes de la médula ósea⁶. Estas CPE han sido una herramienta muy útil (se pueden cuantificar en sangre periférica) para estudiar la dosificación que ha de usarse en los protocolos antiangiogénicos. Una vez establecidas las dosis más efectivas, se comenzaron a estudiar combinaciones de fármacos y sus efectos sobre los tumores, primarios y metastáticos en modelos animales. De estos primeros estudios, se sabe que generalmente es más efectiva una combinación de fármacos que usarlos de forma individual, sin que las combinaciones presentan más toxicidad. El paso siguiente fue comenzar los estudios clínicos en personas.

En la actualidad, en medicina humana está demostrada la eficacia de los fármacos antiangiogénicos usados como monoterapia, pero principalmente si se combinan con la quimioterapia convencional. Las dosis de quimioterapia máximas toleradas matan células tumorales, pero movilizan CEP que son tratadas entonces con los protocolos de terapia antiangiogénica sin dar tiempo a que estas células precursoras colonicen el tumor. Hay decenas de fármacos aprobados o en diferentes fases de estudios clínicos de distintos tumores.

En medicina veterinaria la evidencia disponible es anecdótica, y la mayoría de los datos son extrapolados de medicina humana. Sin embargo, han sido necesarios ajustes en las dosis para evitar problemas de toxicidad (en el primer estudio publicado, un 20% de los casos tratados con ciclofosfamida, a dosis 12,5-25 mg/m², desarrollaron cistitis hemorrágica estéril). El antiinflamatorio no esteroideo del que más evidencia tenemos es el piroxicam^{9,10}. De los demás, hay datos de pequeñas series de casos. Aún no se comprende en profundidad el papel de los AINEs en la inhibición del tumor¹¹. Si COX-2 es constitutivo de tejidos como el cerebro y el riñón, puede no ser deseable inhibir esta vía y, por otra parte, parece que COX-1 puede tener algún papel en la oncogénesis por lo que sería conveniente una inhibición de esa vía para el control del tumor. Por lo tanto, ahora mismo no hay evidencia de que ningún AINE sea más eficaz que otro y la elección debería hacerse basados en la correcta dosificación y tolerancia del fármaco. Hay que tener en cuenta, que en muchos casos se usarán de forma simultánea con fármacos citotóxicos que pueden tener el mismo tipo de toxicidad (p.e. el cisplatino y el piroxicam mostraron alta eficacia en el carcinoma de células transicionales de vejiga, pero con alta toxicidad renal).

Otro problema en veterinaria es la disponibilidad de fármacos estudiados. Uno de los más usados en protocolos en medicina humana es el 5-Fluorouracilo y sus derivados, ya que se pueden administrar por vía oral. Sin embargo, en veterinaria este fármaco produce neurotoxicidad por vía oral en perro (y por cualquier vía de administración en gatos) por lo que no puede ser usado. La ciclofosfamida está disponible en grageas para personas (en una dosis baja) pero esa misma presentación equivale a una dosis alta en veterinaria por lo que no podemos usar las grageas comercializadas y es necesaria una reformulación. Si no está disponible la reformulación en comprimidos, puede usarse la forma inyectable de ciclofosfamida, que viene liofilizada, diluyéndola con suero glucosado. Una vez reconstituida es estable en cristal durante 14 días mantenida en refrigeración. Sin embargo, el uso de esta forma implica que el propietario debe manipular un producto citotóxico, por lo que deben extremarse las medidas de precaución. En nuestro servicio, reconstituimos la medicación y se entrega a propietarios con las instrucciones de usar siempre guantes de látex, manejar la medicación sobre empapadores, y traer al hospital las jeringuillas y botes usados para ser desechados con los residuos citotóxicos en vez de tirarlos a la basura normal. Hay que

recordar que los productos citotóxicos pueden ser perjudiciales para quien los maneja y NUNCA deben ser manipulados por una embarazada o quien esté intentando quedarse embarazada.

Recientemente se ha comercializado un inhibidor Tirosin Quinasa en veterinaria (toceranib fosfato, Palladia, Pfizer) que inhibe diferentes receptores, algunos de ellos como c-kit implicado en la proliferación tumoral, y otros, como VEGFR y PDGFR que participan en la angiogénesis, por lo que está registrado como fármaco antiangiogénico¹²⁻¹⁴. En la actualidad, hay diferentes ensayos clínicos para evaluar su eficacia frente a diferentes tumores usado como terapia antiangiogénica. Masitinib (Masivet, AB Science) es otro inhibidor Tirosin Quinasa, registrado como tratamiento de mastocitomas por su inhibición de c-kit, que inhibe PDGF y con el que en la actualidad se están desarrollando ensayos clínicos evaluando la actividad del fármaco como monoterapia, comparado con su uso como terapia adyuvante de la quimioterapia¹⁵.

La evidencia en estudios de laboratorio y en humana es que las combinaciones de fármacos tienen mejores resultados que las monoterapias, por lo que generalmente no usamos ningún fármaco de forma única. Sin embargo, para intentar disminuir los efectos secundarios tratamos de ajustar la dosis y el protocolo que mejor venga para cada animal. La elección del protocolo que recomendamos se realiza basados en las facilidades para dosificar los fármacos. Los protocolos con Palladia comienzan dando Palladia durante una semana e incorporando el AINE a la semana para ver si los toleran bien. Este esquema nos ayuda a saber si aparecen efectos secundarios a qué fármaco son debidos. En todos los casos es recomendable el uso de protectores gastrointestinales mientras se usen AINEs, al igual que un control riguroso del peso y controlar la presencia de sangrado oculto en heces.

A continuación se detallan los protocolos que usamos habitualmente, ya sea combinados con la quimioterapia "tradicional" o como único tratamiento:

Pioglitazona.

AINE

Ciclofosfamida 10 mg/m² una vez al día

Pioglitazona 1 mg/kg una vez al día (ACTOS 15 mg y ACTOS 30 mg)

Pioglitazona, Clorambucilo.

AINE

Clorambucilo 2 mg/m² cada 48 horas

Pioglitazona 1 mg/kg una vez al día.

Ciclofosfamida.

AINE

Ciclofosfamida 10 mg/m² una vez al día.

Palladia.

Palladia 2.5 mg/kg cada 48 horas

AINE cada 48 horas (alternando con Palladia)

Palladia, Ciclofosfamida.

Palladia 2.5 mg/kg cada 48 horas.

Ciclofosfamida 10 mg/m² al día

AINE cada 48 horas (alternando con Palladia).

Necesitamos unos años para conocer la efectividad real de estos protocolos y cuál es mejor en cada caso. Si ocurre lo mismo que en humana, los nuevos protocolos deberían suponer una mejora en el tratamiento de nuestros pacientes oncológicos, aunque a veces los resultados clínicos, en humana, no han sido lo que se esperaba a partir de los datos iniciales del laboratorio. Por otra parte, deberíamos estar preparados para la aparición de resistencias al tratamiento y conocer cómo manejarlas^{16,17}. Nos queda por aprender cómo manejar diferentes combinaciones en distintos momentos para poder optimizar el resultado de unos tratamientos que suponen un enfoque completamente distinto de lo que hemos hecho durante años en oncología y que, en nuestra experiencia, son ampliamente aceptados por los propietarios de nuestro pacientes oncológicos.

Referencias bibliográficas.

1. Folkman J. Anti-Angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors. *Ann. Surg.* 1972; 175(3): 409-416
2. Klagsbrun M, Soker S. VEGF/VPF: the angiogenesis factor found? *Curr. Biol.* 1993; **3**, 699-702
3. Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol. Med.* 1995; **1**, 120-122
4. Pérez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Pathol.* 1997; **150**, 815-820
5. Klement G, Baruchel S, Rak J *et al.* Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J. Clin. Invest.* 2000; 105(8):15-24
6. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(7): 1878-1886
7. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 2000; **105**, 1045-1047
8. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT *et al.* Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60:1306-1311
9. Lana S, U'ren L, Plaza S *et al.* Continuous Low-Dose Oral Chemotherapy for Adjuvant Therapy of Splenic Hemangiosarcoma in Dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21:764-769
10. Elmslie RE, Glawe P, Dow SW. Metronomic Therapy with Cyclophosphamide and Piroxicam Effectively Delays Tumor Recurrence in Dogs with Incompletely Resected Soft Tissue Sarcomas. *J Vet Intern Med* 2008; 22:1373-1379
11. Hayes A. Cancer, cyclo-oxygenase and nonsteroidal anti-inflammatory drugs – can we combine all three? *Veterinary and Comparative Oncology* 2007; **5**, 1,1-13
12. London CA, Hannah AL, Zadovskaya R *et al.* Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res.* 2003; **9**:2755-2768
13. Pryer NK, Lee LB, Zadovskaya R *et al.* Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin Cancer Res*, 2003; **9**:5729-5734
14. London CA, Malpais PB, Follis SL *et al.* Multicenter, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral Palladia (SU11654) in the treatment of dogs with recurrent mast cell tumors. *Clin Cancer Res.* 2009; **15**:3856-3865
15. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 2008; 22:1301-1309
16. Tang TC, Man S, Xu P *et al.* Development of a Resistance-like Phenotype to Sorafenib by Human Hepatocellular Carcinoma Cells Is Reversible and Can Be Delayed by Metronomic UFT Chemotherapy. *Neoplasia.* 2010; 12(11) 928-940
17. Ebos JM, Lee CR, Kerbel RS. Tumor and Host-Mediated Pathways of Resistance and Disease Progression in Response to Antiangiogenic Therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5020-5025

ENFERMEDADES LINFOPROLIFERATIVAS

J. Pastor

Facultad de Veterinaria- Universidad Autónoma de Barcelona-08193-Bellaterra

Con la aparición de nuevas técnicas el diagnóstico y pronóstico de enfermedades linfoproliferativas ha mejorado. El objetivo de esta conferencia es introducir al clínico la importancia del inmunofenotipaje y de técnicas de PARR en enfermedades linfoproliferativas.

PCR para ANTIGEN RECEPTOR REARRANGEMENT (PARR)

La caracterización molecular de las neoplasias hemolinfáticas ha llevado al desarrollo de pruebas diagnósticas útiles y novedosas para el veterinario. En medicina humana estas nuevas técnicas han permitido detectar 1 célula neoplásica entre miles, y eso ha hecho que el diagnóstico pueda ser precoz y se pueda monitorizar mejor la respuesta al tratamiento. Las enfermedades linfoproliferativas se caracterizan por la expansión clonal de linfocitos, las poblaciones de linfocitos neoplásicos se pueden identificar mediante el establecimiento de la presencia de poblaciones clonales de linfocitos y la prueba de PARR se basa en la premisa de que son neoplasias hematológicas clonales.

La detección de clonalidad se basa en el hecho de que los linfocitos contienen regiones de ADN que son únicas en longitud y secuencia. Este es el resultado de la recombinación de segmentos génicos V, D y J (células B) o la V y segmentos J (células T) para producir la región CDR3 que codifica la porción de unión al antígeno de la inmunoglobulina (Ig) de cadena pesada o el receptor de células T gamma (TCR γ). La metodología actual utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar reordenamientos del receptor de antígeno (PARR), con las regiones conservadas de los genes V y J para amplificar la región deseada CDR3. La detección de poblaciones clonales de linfocitos por este método está bien establecido en medicina humana, y es habitualmente utilizado en varios laboratorios veterinarios para ayudar en el diagnóstico de linfoma y leucemia. Es importante señalar que las condiciones para el ensayo tiene un profundo efecto en la sensibilidad y la especificidad de los resultados.

Recientemente se ha descrito que en el 73% de los pacientes con clones malignos en los ganglios linfáticos también tenían células malignas en sangre periférica (Lana et al). Sólo el 21% de los pacientes tenían células malignas detectables por microscopía óptica lo que indica que la prueba PARR es sensible y que la mayoría de los pacientes tienen la enfermedad no detectada previamente en la sangre periférica. La mayoría de los pacientes tratados para el linfoma canino (> 80%) se puede lograr una remisión clínica completa. Sin embargo, las curas son poco frecuentes y la mayoría recidivan y mueren a causa de enfermedad. En medicina humana se utiliza mucho el concepto de enfermedad mínima residual (EMR), y en la actualidad se está reintroduciendo en medicina veterinaria, sobretudo con la utilización de las nuevas tecnologías como citometría de flujo y PARR. El fundamento para el estudio de EMR es mejorar la medición de la respuesta al tratamiento, proporcionar información pronóstica, y en última instancia optimizar el tratamiento. La presencia de EMR es de utilidad en niños con linfoma, y personas con linfoma folicular o del manto, siendo muy importantes para el pronóstico de la enfermedad en estas personas. Estos resultados sugieren que el comportamiento biológico y la posterior capacidad de eliminar la neoplasia con quimioterapia varía entre el subtipo histológico mismo, inmunológico y agrega información pronóstica valiosa para el manejo clínico de estas enfermedades. En las neoplasias hematológicas canino, un informe de seguimiento de EMR en 8 pacientes caninos con linfoma se describe que con quimioterapia se alcanza un 50% de remisiones completas. Aunque estamos pendientes de ver nuevos estudios que puedan aportar más información de la utilidad de estas técnicas.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una prueba analítica que se puede utilizar para evaluar células en suspensión basado en la tinción de las células con fluorocromos específicos, los cuales al pasar a través de una cámara de citometría de flujo emiten diferentes longitudes de onda y se puede apreciar si estos fluorocromos muchas veces adheridos a anticuerpos específicos se han adherido a la célula. Las células se ordenan en ventanas (gates) de acuerdo a las características de tinción de las diferentes poblaciones. Las células también se pueden

clasificar por tamaño. Casi cualquier suspensión, tanto sangre periférica, médula ósea o incluso citologías de masas sólidas, mientras las células estén individuales, pueden ser analizadas por citometría de flujo. Con respecto a los linfocitos esta técnica puede también establecer si la población de linfocitos está dominado por un solo fenotipo de linfocitos (neoplasia) o la expansión heterogénea (hiperplasia reactiva) - tiene la ventaja de que un gran panel de anticuerpos pueden ser utilizados en muestras de recién aspirada, pero la desventaja de no permitir examinar las células dentro del contexto de la arquitectura de los ganglios linfáticos. Un estudio reciente (Williams et 2008) indica que aquellos animales con linfocitosis y con alta expresión de CD21 tenían una supervivencia media más corta 129 comparados con lo que no presentaban estas células que eran de 325 días.

Otra situación clínica en la que la citometría de flujo ha sido de gran ayuda es el diagnóstico de masas mediastínicas. En la mayoría de los casos las diferencias más importantes incluyen timoma o linfoma. La mayoría de los timocitos deben expresar CD4 y CD8. Este fenotipo único permite la diferenciación de las células de casi todas las demás poblaciones linfoides, incluyendo los tumores malignos. En un estudio con perros con un diagnóstico definitivo que se presentó con una masa mediastínica, se analizaron muestras evaluadas por citometría de flujo. De ellas, se observó que los animales con timoma tenían más del 10% de CD4 + / CD8 +, mientras que los linfomas tenían menos del 2% CD4 + / CD8 +.

Bibliografía

- Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery AC. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol.* 2003 Jan;40(1):32-41.
- Keller RL, Avery AC, Burnett RC, Walton JA, Olver CS. Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Vet Clin Pathol.* 2004;33(3):145-9.
- Lana SE, Jackson TL, Burnett RC, Morley PS, Avery AC. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2006 Mar-Apr;20(2):329-34.
- Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G, Famigli-Bergamini P. GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Jan 15;127(1-2):47-56.
- Gentilini F, Dondi F, Mastroilli C, Giunti M, Calzolari C, Gandini G, Mancini D, Bergamini PF. Validation of a human immunoturbidimetric assay to measure canine albumin in urine and cerebrospinal fluid. *J Vet Diagn Invest.* 2005. Mar;17(2):179-83.
- Williams MJ, Avery AC, Lana SE, Hillers KR, Bachand AM, Avery PR. Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: immunophenotypic markers of prognosis. *J Vet Intern Med.* 2008 May-Jun;22(3):596-601.