

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



**FOSFATO DE TOCERANIB
(PALLADIA®) COMO NUEVA TERAPIA
EN TUMORES MAMARIOS CANINOS Y
FELINOS**

TESIS DOCTORAL

Autor: Juan Fco Borrego Massó
Directores: Dr. Enric Poch Jiménez
Dr. Ignacio Pérez Roger

VALENCIA 2017



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Enric Poch Jiménez e **Ignacio Pérez Roger**, Profesores del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera,

INFORMAN: que el trabajo titulado “Fosfato de toceranib (palladia®) como nueva terapia en tumores mamarios caninos y felinos” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera por **Juan Francisco Borrego Massó**, Licenciado en Veterinaria.

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para que el interesado pueda optar al título de Doctor por la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Valencia, 20 de Marzo de 2017

Enric Poch Jiménez

Ignacio Pérez Roger

RESUMEN

Los tumores de mama representan uno de los tumores más frecuentes en perros y gatos, no existiendo un tratamiento médico de elección en su presentación macroscópica o como terapia adyuvante tras la intervención quirúrgica. Por otro lado, y debido a las similitudes tanto clínicas como genéticas de estos tumores con los tumores mamarios en humanos, los hacen un modelo único de oncología comparada, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales que permitan mejorar su tratamiento.

En este trabajo se han realizado dos estudios prospectivos con fosfato de toceranib (Palladia®) como monoterapia en gatas con tumores mamarios o en combinación con carprofeno, en perras con carcinoma inflamatorio (CIC). Los objetivos planteados incluyeron evaluar la eficacia antitumoral y tolerabilidad de los tratamientos en ambas especies. En el caso de las perras con CIC, también se incluyó como objetivo la evaluación de la calidad de vida.

El protocolo de fosfato de toceranib en gatas o en combinación con carprofeno en perras con carcinoma inflamatorio fue muy bien tolerado y los efectos adversos fueron generalmente leves resolviéndose con tratamiento de soporte.

La administración de fosfato de toceranib en tumores mamarios felinos demostró eficacia biológica, con una tasa de respuesta del 35.2% siguiendo criterios RECIST y un beneficio clínico en el 64% de los casos. Los resultados del tratamiento en el caso de los tumores mamarios felinos son comparables con los descritos tras la utilización de quimioterapia tradicional y sugieren que este fármaco podría ser eficaz en enfermedad residual mínima después de un tratamiento quirúrgico, algo que se debería evaluar en estudios prospectivos.

El tratamiento con fosfato de toceranib y carprofeno en perras con CIC no mostró eficacia biológica siguiendo criterios RECIST. No obstante, un 64% de los pacientes presentaron beneficio clínico a los dos meses de iniciar el protocolo entendiéndose como una mejoría en la calidad de vida y la no progresión de la enfermedad. La alta tasa de enfermedades estables comparado con otros estudios y la mejoría de la calidad de vida de las perras, convierte esta combinación en otra posibilidad terapéutica a considerar.

Finalmente, en este estudio se evaluó de manera subjetiva y a través de un cuestionario dirigido a los propietarios los cambios en la calidad de vida del paciente a lo largo del tratamiento con fosfato de toceranib. Algunas de las categorías del cuestionario de calidad de vida donde los dueños en al menos una de las preguntas

percibieron mejoría y que fueron estadísticamente significativas incluyeron: felicidad, estado mental, apetito y movilidad general.

Este trabajo en su conjunto describe por primera vez el uso de fosfato de toceranib como nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de tumores mamarios felinos y carcinomas inflamatorios caninos.

Palabras clave: Fosfato de Toceranib, Palladia, Tumores mamarios felinos, Carcinoma inflamatorio canino, CIC, Inhibidores tirosín quinasa, ITQ, Oncología comparada

SUMMARY

Mammary tumors represent one of the most frequent tumors in dogs and cats, lacking of a standardized medical treatment in its macroscopic presentation or in the adjuvant setting after surgery. The clinical and genetic similarities of these tumors with breast cancer in women make them a unique model of comparative oncology, allowing the development of new antitumor strategies, which could improve their treatment.

This project includes two prospective studies with toceranib phosphate (Palladia®) as monotherapy in cats with mammary tumors, or in combination with carprofen in bitches with inflammatory mammary carcinoma (IMC). The objectives were to evaluate the antitumor efficacy and tolerability of the treatments in both species. In the case of bitches with IMC, quality of life assessment was also included as an objective.

The toceranib phosphate protocol in cats or in combination with carprofen in bitches with inflammatory carcinoma was very well tolerated and adverse effects were generally mild and resolved with standard supportive care.

The administration of toceranib phosphate in feline mammary tumors demonstrated biological efficacy, with a response rate of 35.2% following RECIST criteria and clinical benefit in 64% of the cases. These results are comparable with traditional chemotherapy response rates and also suggest that this drug may be effective in the microscopic disease setting after surgical treatment, which should be assessed in prospective studies.

The combination of toceranib phosphate and carprofen in bitches with IMC did not show biological efficacy following RECIST criteria. However, 64% of the patients presented clinical benefit at two months after initiating the protocol, defined as an improvement in the quality of life and no progression of the disease. The high rate of stable diseases compared to other studies and the improvement of the quality of life of the bitches, makes this combination another option to consider in their treatment.

Finally, in this study, subjective changes in quality of life were evaluated through a questionnaire filled by the owners in each visit. Some of the categories of the quality of life questionnaire where the owners perceived statistically significant improvement included: happiness, mental state, appetite and general mobility.

This work as a whole describes for the first time the use of toceranib phosphate as a new therapeutic strategy for the treatment of feline mammary tumors and canine inflammatory carcinomas.

Key words: Toceranib phosphate, Palladia, Feline mammary tumors, Inflammatory mammary carcinoma, IMC, Tyrosine kinase inhibitors, TKI, Comparative oncology.

Parece mentira pero ya han pasado 5 años desde que recién llegado a España de acabar mi residencia, comencé este proyecto. No ha sido fácil y han pasado muchas cosas durante estos cinco años, pero este trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, han participado distintas personas opinando, corrigiendo, o simplemente teniendo paciencia conmigo en los malos momentos, a las cuales me gustaría agradecer.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, Dr. Enric Poch e Ignacio Pérez, mi más amplio agradecimiento por haber aceptado dirigirme en este proyecto. A Enric en especial, por su valiosa dirección y apoyo, por su paciencia ante el cambio de enfoque de la tesis y asomarse a la oncología veterinaria con una mente abierta, entendiendo a la perfección la importancia de la oncología comparada, así como su determinación para llegar a tiempo a la conclusión del proyecto.

Mis agradecimientos a la colaboración de los diferentes compañeros veterinarios que buscando la mejor opción para sus pacientes y confiando en nuestro trabajo, remitieron pacientes en ambos estudios. Por supuesto a los dueños de las mascotas que a pesar de la mala noticia que representa un diagnóstico de cáncer en un ser querido, tuvieron la fuerza y el coraje de acudir a nuestra consulta para valorar las mejores opciones disponibles de tratamiento. Además agradecerles el que superasen las connotaciones negativas asociadas a los estudios clínicos, involucrándose de forma activa en el proceso. Sin su colaboración y adhesión a los parámetros y visitas marcados en ambos ensayos clínicos, estos resultados no hubiesen sido posibles. Son estos pacientes y dueños los que en múltiples países hacen posible el avance que estamos viendo en la oncología veterinaria en general y la comparada en particular.

Por supuesto agradecer a mis compañeros de trabajo en los diferentes centros donde se han evaluado los pacientes. Auxiliares, veterinarios, patólogos y radiólogos que han procesado muestras y han ayudado en el diagnóstico o manejo de los casos. Especialmente a Ricardo Guillem por facilitarme algunas de las imágenes y comentarios radiográficos así como Carolina Naranjo facilitándome imágenes y descripciones detalladas de algunas de las muestras de histopatología.

Por supuesto a todos mis compañeros del Hospital Aúna Especialidades Veterinarias. Las casualidades de la vida han hecho que el periodo final de este trabajo coincida con el nacimiento de un proyecto tan grande como Aúna. Mis socios me han

apoyado y animado en los peores momentos facilitándome el tiempo que necesitaba para finalizar esta Tesis.

Agradecer a Zoetis y Antonio Serrano en particular el escuchar y apoyar uno de los estudios. No es fácil encontrar en España alguien que no solo comprenda la utilidad de este tipo de estudios si no que lo demuestre, dedicando tiempo para estudiar el proyecto e involucrarse de verdad.

Pero todo esto no hubiese sido posible sin el amparo y cariño incondicional de mi mujer, Elisa. Nunca podré agradecerle suficiente la paciencia infinita en los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme estando ahí en lo bueno y en lo malo. Sus consejos y críticas, viniendo de la persona que más admiro profesionalmente y mi mejor amiga, han sido valiosísimos, ¿quien puede pedir más?. Siempre nos hemos dado ánimos en nuestro camino profesional y personal, y esta tesis es solo otro de los retos a los que nos hemos enfrentado, superándolo juntos.

Agradecer también a mi familia, a mi hermana y mi madre por el apoyo, sin a veces entender muy bien que es lo que hacia cuando hablaba de la tesis. A mi padre que me inculcó casi todo lo que soy en la vida, y que solo espero que allí donde esté pueda ver un poco de lo que he conseguido siempre intentando seguir sus pasos, su integridad y sus valores.

A Michelle Tureck, David Vail, Timothy Stein y Ruthanne Chun, mis mayores mentores y los oncólogos veterinarios que más admiro, sin los que nunca hubiese sido posible llegar a dedicarme a la oncología veterinaria, especialidad que me sigue ilusionando como el primer día, haciéndome disfrutar de mi profesión y que me hace poder ayudar a tantos pacientes y dueños en esta batalla contra una enfermedad que seguro algún día ganaremos.

Gracias a todos



Índice

Abreviaturas.....	5
Introducción.....	9
1. <i>Estudios clínicos en oncología veterinaria y su aportación a la medicina traslacional.....</i>	11
1.1 <i>Tumores de mama como modelo de oncología comparada.....</i>	14
2. <i>Generalidades de los tumores mamarios caninos y felinos.....</i>	16
2.1 <i>Incidencia-Etiología.....</i>	16
2.2 <i>Patología y comportamiento biológico de los tumores mamarios.....</i>	19
2.3 <i>Clasificación y presentación clínica de los tumores mamarios.....</i>	20
2.3.1 <i>Particularidades de la presentación clínica del carcinoma inflamatorio.....</i>	21
2.4 <i>Diagnóstico de los tumores mamarios.....</i>	22
2.5 <i>Estadio clínico de los tumores mamarios.....</i>	23
2.6 <i>Tratamiento de los tumores mamarios.....</i>	23
2.6.1 <i>Cirugía.....</i>	23
2.6.2 <i>Quimioterapia.....</i>	25
3. <i>Papel de la angiogénesis y la inflamación en los tumores mamarios...</i>	26
3.1 <i>Prostaglandinas y ciclooxigenasas.....</i>	26
3.2 <i>Papel de COX-2 en el cáncer.....</i>	27
3.2.1 <i>COX-2 y su relación con el cáncer de mama.....</i>	28
3.2.2 <i>COX-2 y la angiogénesis en el carcinoma inflamatorio canino.....</i>	29
3.2.3 <i>Uso de inhibidores COX-2 en el tratamiento del cáncer.....</i>	30
3.2.4 <i>Uso de inhibidores COX-2 en tumores mamarios caninos.....</i>	30
4. <i>Inhibidores tirosín quinasa y su utilización en el tratamiento de los tumores mamarios.....</i>	32
4.1 <i>Receptores tirosín quinasa.....</i>	32
4.2 <i>Papel de los receptores tirosín quinasa en cáncer.....</i>	33
4.3 <i>Inhibidores tirosín quinasa en medicina veterinaria.....</i>	34
4.4 <i>Utilización del fosfato de toceranib en tumores caninos.....</i>	35
4.4.1 <i>Fosfato de toceranib en tumores de mama.....</i>	37
4.4.2 <i>Fosfato de toceranib en tratamientos multimodales.....</i>	37
4.5 <i>Utilización del fosfato de toceranib en tumores felinos.....</i>	40
Objetivos.....	43
Material y Métodos.....	47
1. <i>Metodología utilizada en el estudio del fosfato de toceranib en tumores mamarios felinos.....</i>	49
1.1 <i>Diseño del estudio.....</i>	49
1.2 <i>Selección de pacientes.....</i>	49
1.3 <i>Recogida de datos.....</i>	54
1.4 <i>Evaluación de la respuesta tumoral.....</i>	54
1.5 <i>Evaluación de la toxicidad.....</i>	55

2. Metodología utilizada en el estudio del fosfato de toceranib en carcinomas inflamatorios caninos.....	57
2.1 Diseño del estudio.....	57
2.2 Selección de pacientes.....	57
2.3 Recogida de datos.....	60
2.4 Evaluación de la respuesta tumoral.....	61
2.5 Evaluación de la toxicidad.....	61
3. Estadística.....	62
Resultados.....	65
1. Estudio del fosfato de toceranib en tumores mamarios felinos.....	67
1.1 Población de estudio.....	67
1.2 Tratamiento con fosfato de toceranib y efectos adversos.....	73
1.3 Respuesta.....	75
1.4 Seguimiento y tratamientos posteriores.....	79
2. Estudio del fosfato de toceranib en carcinomas inflamatorios caninos.....	83
2.1 Población de estudio.....	83
2.2 Tratamiento con fosfato de toceranib y efectos adversos.....	90
2.3 Respuesta.....	92
2.4 Calidad de vida.....	95
2.5 Seguimiento y tratamientos posteriores.....	97
Discusión.....	101
Conclusiones.....	127
Bibliografía.....	131
Anexos.....	I



Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALT	Alanina Aminotransferasa
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
BPC	Buena Práctica Clínica
CCOGC	Consortio canino de genómica y oncología comparada
CI	Carcinoma Inflamatorio
CIC	Carcinoma Inflamatorio Canino
CIH	Carcinoma Inflamatorio Humano
COP	Programa de Oncología Comparada
COTC	Consortio de ensayos Comparativos de Oncología
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CSF1R	Receptor del factor estimulante de las colonias 1
DER-2	Receptor de factor de crecimiento epidérmico de perro 2
DMT	Dosis Máxima Tolerada
EE	Enfermedad Estable
EP	Enfermedad Progresiva
FA	Fosfatasa Alcalina
FC	Factores de crecimiento
FDA	Administración de Comida y Fármacos Americana
FGFR	Receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos
GIST	Tumor gastrointestinal estromal
HE	Hematoxilina-Eosina
HER-2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal Humano - 2
IHQ	Inmunohistoquímica
ITQ	Inhibidor Tirocin Quinasa
IRIS	Sociedad Internacional con Interés Renal
IV	Intravenoso
IVOC	Instituto Veterinario Oncología Comparada
JAK	Quinasa Janus
MCT	Mastocitoma
NCI	Instituto Nacional del Cancer
OHE	Ovariohisterectomía
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAF	Punción con Aguja Fina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFR	Receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PGG2	Prostaglandina G2
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PGH2	Prostaglandina H2

PT	Proteínas totales
QM	Quimioterapia metronómica
RC	Respuesta Completa
RECIST	Criterios de evaluación de respuesta en tumores solidos
RP	Respuesta Parcial
RTQ	Receptores Tirosín Quinasa
SC	Subcutáneo
SLP	Supervivencia mediana libre de progresión
ST	Supervivencia mediana total
TAC	Tomografía axial computerizada
Tie-1	Receptores de la angiopoyetina-1
Tie-2	Receptores de la angiopoyetina-2
TLE	Tiempo Libre de Enfermedad
TLD	Toxicidad limitante de dosis
Tregs	Linfocitos T Reguladores
TXA	Tromboxano
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
VCOG-CTACE	Criterios de Terminología Común Veterinaria del Grupo de Oncología Cooperativa



Introducción

El cáncer es la primera causa de muerte en perros, siendo responsable de un 27-30% de las muertes, aumentando hasta el 50% en algunas razas como el Golden Retriever o el Boyero de Berna (Adams *et al.*, 2010; Fleming *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2013)

Las similitudes tanto clínicas como genéticas entre perros, gatos y personas hacen de estos animales que desarrollan tumores de forma espontánea, un modelo único para la investigación del cáncer (Davis *et al.*, 2014; Riccardo *et al.*, 2014; Alvarez 2014; Rowell *et al.*, 2011 Paoloni *et al.*, 2008). En la actualidad existen numerosos estudios que demuestran las similitudes de tumores humanos y caninos en casos como son: los tumores de vejiga (Dhawan *et al.*, 2015; Rathore *et al.*, 2014), el osteosarcoma (Angstadt *et al.*, 2011; Rankin *et al.*, 2011, 2012; Fenger *et al.*, 2014), los tumores cerebrales (Thomas *et al.*, 2009; Hicks *et al.*, 2015; LeBlanc *et al.*, 2016, 2016), melanoma (Simpson *et al.*, 2014) o tumores de mama (Queiroga *et al.*, 2011; Uva *et al.*, 2009) entre otros.

A pesar de los indudables avances en el tratamiento del cáncer tanto en medicina humana como veterinaria, son necesarios nuevos tratamientos en determinados tipos de cáncer que siguen sin terapias realmente efectivas. Gran parte de la investigación se ha basado en modelos animales que a pesar de sus ventajas, presentan también algunas limitaciones, tanto desde el punto de vista clínico como ético (Vail 2007). Los modelos murinos de tradicionalmente utilizados para el estudio del cáncer humano, aun siendo los más frecuentes y a pesar de la su incuestionable importancia y papel desarrollado a lo largo de la historia poseen algunas limitaciones. La más significativa es que en los ratones los tumores no se desarrollan espontáneamente, como sí sucede en los seres humanos, implicando posibles diferencias en el proceso de la carcinogénesis, además de las diferencias en la tolerabilidad de ciertos fármacos (Rangarajan *et al.*, 2003). Además los modelos en ratones tampoco representan de forma exacta otras características observadas en los pacientes oncológicos en medicina humana, como son los largos períodos de latencia, inestabilidad genómica, además de la compleja biología de las recidivas del cáncer y proceso de metástasis, fundamentales en los resultados y pronóstico en los tumores en medicina humana (Paoloni *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2016).

Por otra parte, mutaciones frecuentes en tumores humanos, han sido también descritas en tumores espontáneos caninos. Algunos ejemplos son la mutación V600E en BRAF, en carcinoma de próstata, carcinoma urotelial, melanoma, glioma o tumor de vaina nerviosa periférico de los perros (Mochizuki *et al.*, 2015; Decker *et al.*, 2015) o las mutaciones del proto-oncogen c-kit, presente en perros con mastocitomas (London *et al.*, 1999) o tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (Irie *et al.*, 2015).

Además, los perros y gatos comparten el mismo medio ambiente que los humanos estando expuestos a los mismos carcinógenos en muchos casos. Es por todas estas razones que ya se reconoce a los tumores espontáneos en perros y gatos como un modelo más apropiado para los estudios en oncología y poder trasladar algunos de los resultados obtenidos a la clínica humana desarrollando nuevos tratamientos que en muchos casos no se pueden obtener con los modelos animales convencionales o ensayos clínicos con personas (Khanna *et al.*, 2009), ofreciendo nuevas posibilidades para estudiar la carcinogénesis y la utilización de nuevos fármacos contra el cáncer tanto para uso humano como animal (Paoloni *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2016).

Por ello el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) reconoció formalmente el potencial para avanzar en el estudio del cáncer en animales de compañía mediante el establecimiento del Programa de Oncología Comparada (COP) en el año 2003 (Paoloni *et al.*, 2008). Son ya varios los estudios llevados a cabo por estas instituciones que han facilitado información a estudios de medicina humana (Paoloni *et al.*, 2009, 2010, 2014).

Los estudios traslacionales facilitan la transición desde la investigación básica a la aplicación clínica. Cuando son realizados en perros con cáncer, son óptimos porque ofrecen un abordaje integral, siendo un paso intermedio entre los modelos preclínicos convencionales (ratón, perros de investigación y primates) y los ensayos clínicos con humanos (**Figura 1**). Actualmente, existen unas necesidades urgentes en la comunidad científica oncológica para el desarrollo de nuevos fármacos o combinaciones de éstos. Sin embargo el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer es un procedimiento bastante ineficiente, donde sólo aproximadamente el 10% de los nuevos agentes que entran en ensayos clínicos de fase I reciben la aprobación del mercado por agencias de medicamentos como la Administración de Comida y Fármacos Americana (FDA) (Hay *et al.*, 2014; Stapff 2008; Paoloni *et al.*, 2008), además del largo proceso de desarrollo de un fármaco que puede tardar

hasta 15 años (Wu *et al.*, 2016). Si se utilizase un enfoque integrado, es probable que las preguntas importantes acerca de un nuevo candidato a fármaco se pudieran responder antes de su introducción en estudios en humanos (Paoloni *et al.*, 2008).

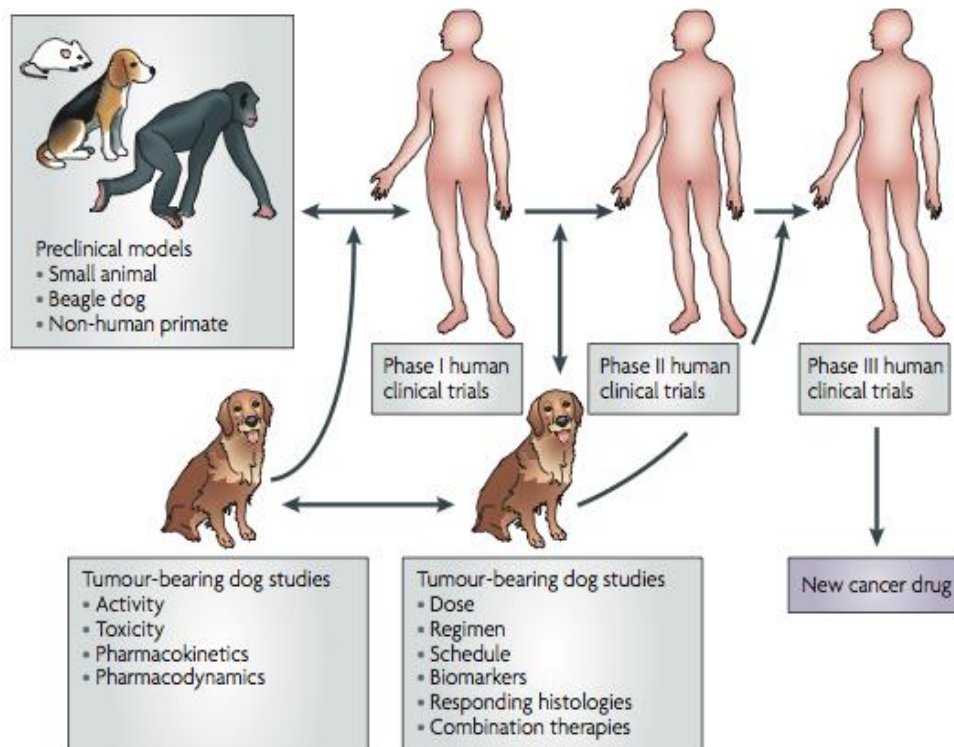


Figura 1. Modelo canino en oncología comparada y su integración en las fases tradicionales de estudios clínicos en medicina humana. La mayoría de los estudios preclínicos que avanzan a ensayos clínicos en humanos fallan en la fase I/II. Este fracaso probablemente se deba a la gran brecha traslacional entre un modelo de xenoinjerto murino y un huésped humano inmunocompetente. La oncología comparada proporciona una plataforma ideal para salvar esta brecha utilizando al perro con cáncer para este enfoque integrado pudiendo contestar preguntas acerca de la toxicidad, eficacia, farmacocinética o farmacodinamia, y dosis de un fármaco (Paoloni *et al.*, 2008).

Otro de los aspectos positivos del modelo canino es el menor tiempo entre el desarrollo de la enfermedad y respuesta al tratamiento, además de que los ensayos clínicos en perros y gatos no están limitados por los diseños de ensayos de fase I-III habituales en medicina humana, pudiéndose ofrecer nuevos fármacos a pacientes que o bien no hayan recibido el tratamiento estándar o bien porque no existe tratamiento estándar en medicina veterinaria (Paoloni *et al.*, 2008; Khanna *et al.*, 2009).

Ejemplos de los frutos de la investigación traslacional han sido el desarrollo de una vacuna contra el melanoma canino como primer paso para el desarrollo de la

vacuna para humanos (Bergman *et al.*, 2008), o el uso combinado de fármacos antiangiogénicos (aprobados tanto para personas como para animales) y radioterapia (Kleibeuker *et al.*, 2015; Jakob *et al.*, 2015; Carlsten *et al.*, 2011). Tal vez el mejor ejemplo de cómo las dos disciplinas podrían cooperar en el desarrollo traslacional de agentes en oncología humana y veterinaria fue el desarrollo paralelo del compuesto SU11654 en perros, más tarde conocido como fosfato de toceranib (Palladia® Pfizer Inc.) y el SU11248 ahora denominado sunitinib (Sutent® Pfizer Inc.) en pacientes con cáncer humano (Paoloni *et al.*, 2008).

Gracias a este interés y apoyo del NCI y la creación del programa de oncología comparada (COP) uno de los grandes logros en la última década ha sido el desarrollo de grupos/consorcios para llevar a cabo ensayos clínicos multicéntricos a través del Consorcio de Ensayos Comparativos de Oncología (COTC) en más de 20 instituciones académicas veterinarias en Estados Unidos de America. Estos grupos incluyen entre otros el Consorcio Canino de Genómica y Oncología Comparada (CCOGC) en el año 2006. Estos estudios ya han facilitado información a estudios de medicina humana (Paoloni *et al.*, 2009, 2010, 2014; Leblanc *et al.*, 2016). Además se ha creado un depósito de muestras biológicas tumorales de perros y gatos facilitando el acceso a muestras de gran calidad a los investigadores veterinarios y de medicina humana que estén interesados en estudiar posibles dianas terapéuticas o estudios traslacionales (**Figura 2**).

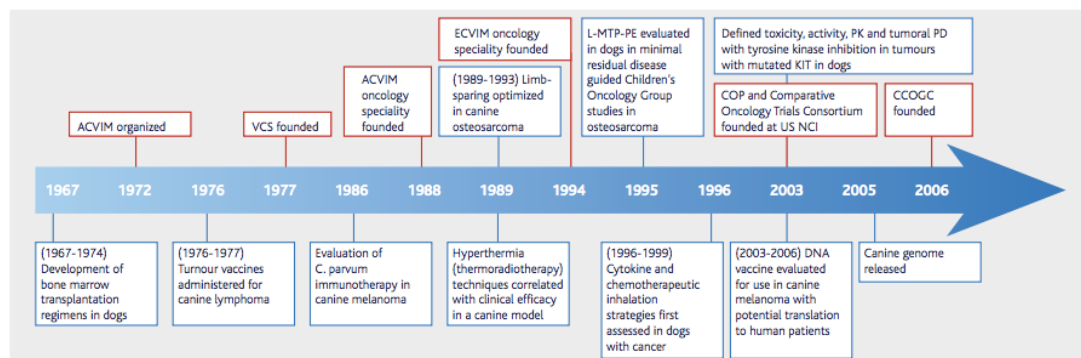


Figura 2. Resumen de la evolución de la oncología comparada así como el desarrollo de los distintos consorcios. La oncología comparada nos facilita una oportunidad única para avanzar en el conocimiento y desarrollo de nuevos tratamientos tanto en medicina humana como en veterinaria (Paoloni *et al.*, 2008).

1.1 Tumores de mama como modelo de oncología comparada

Los tumores mamarios caninos y felinos llevan años postulándose como un modelo para el estudio del cáncer de mama en mujeres, debido a la gran cantidad

de similitudes entre ellos, incluyendo datos epidemiológicos y los patrones histológicos de las lesiones neoplásicas (Strandberg *et al.*, 1974; Visan *et al.*, 2016; Caceres *et al.*, 2016; Burrari *et al.*, 2010; Caliari *et al.*, 2015; Shafiee *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2016). Al igual que en mujeres, el cáncer de mama es el cáncer más común en perras y gatas no esterilizadas (Sorenmo *et al.*, 2012). Uno de los factores más importantes implicados en la etiología de la enfermedad, tanto en animales como en humanos, es la influencia hormonal (Queiroga *et al.*, 2011; Sorenmo *et al.*, 2012; Gery *et al.*, 2010).

Otra de las similitudes encontradas entre los seres humanos y perros es el componente genético y riesgo hereditario de padecer cáncer de mama. BRCA1 y BRCA2 son genes supresores tumorales y mutaciones en estos genes conducen a la acumulación de daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el aumento de la posibilidad de desarrollar cáncer de mama y ovario en mujeres (Rivera *et al.*, 2011). Tanto BRCA1 como BRCA2 se han identificado también en el desarrollo de tumores mamarios en el Springer Spaniel Inglés (Rivera *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011).

Los tumores mamarios felinos habitualmente negativos a receptores de estrógeno, progesterona y del receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano-2 (HER2) se han propuesto como un modelo de tumores con un fenotipo "triple-negativo" en medicina humana. Este termino se suele utilizar para describir un subtipo de tumor de mama definido por la ausencia de expresión de los receptores de estrógenos y progesterona y la falta de amplificación del gen de HER2, siendo uno de los más agresivos en medicina humana y que en mujeres representan un 15% de todos los tumores de mama (Caliari *et al.*, 2014).

En el caso de los perros también se ha descrito un homólogo de HER-2 con un 92% de coincidencia de aminoácidos, denominándose en esta especie como "Receptor del factor de crecimiento epidérmico de perro 2" (DER-2), con implicaciones biológicas similares a las del cáncer de mama humano. Al igual que ocurre en medicina humana donde existen anticuerpos anti-HER-2, este antígeno supone una diana en medicina veterinaria para el desarrollo de nuevas terapias inmunológicas que no solo facilitaría el tratamiento en perros, si no que podrían facilitar información de posibles combinaciones o tratamientos multifármaco a medicina humana (Fazekas *et al.*, 2016).

Por otro lado, recientemente se ha secuenciado el genoma canino, lo que proporciona nuevas herramientas para el estudio de la biología del cáncer en esta especie, así como la búsqueda de nuevos tratamientos (Paoloni *et al.*, 2008;

Lindbland *et al.*, 2008). Un reciente estudio presentó el primer análisis de los cambios transcripcionales que ocurren en los tumores mamarios en perras, incluyendo un análisis comparativo con respecto a los tumores de mama humanos (Uva *et al.*, 2009). Este análisis ha revelado una estrecha similitud entre los tumores humanos y de los perros con respecto a los cambios en la expresión de genes relacionados con las vías de establecimiento del tumor. Algunos ejemplos son las vías de trasducción de señales "PI3K/ AKT", "KRAS", "PTEN", "WNT-beta catenin" y "señalización MAPK", así como un grupo de genes específicos de células iniciadoras tumorales humanas (CD44+ CD24-). Dado que la desregulación de estas vías celulares están estrechamente vinculadas a la sensibilidad a los agentes terapéuticos dirigidos (Bild *et al.*, 2006), estos estudios ponen de relieve el potencial del perro como un modelo preclínico para probar los agentes terapéuticos dirigidos a las vías comúnmente desreguladas en los tumores mamarios de las dos especies. Es importante destacar que la estrecha similitud observada entre los tumores en humana y veterinaria también debe facilitar enormemente el desarrollo de biomarcadores para evaluar y medir la respuesta de fármacos (Uva *et al.*, 2009).

Por último, la relación entre factores ambientales y la aparición de ciertos tipos de cáncer ha sido ampliamente descrita en la especie humana (Hiatt *et al.*, 2009). El hecho de que el cáncer de mama en perros y gatos sea una enfermedad espontánea y que los perros y gatos están expuestos a un medio ambiente similares a los de sus homólogos humanos, es otra de las características que los convierte en un modelo excelente para el estudio del cáncer de mama en mujeres (Queiroga *et al.*, 2011; Caliari *et al.*, 2014).

2 GENERALIDADES DE LOS TUMORES MAMARIOS CANINOS Y FELINOS

2.1 Incidencia-Etiología

Los tumores mamarios son el tipo tumoral más común de la perra no castrada, constituyendo aproximadamente el 50% de todos los tumores (Sorenmo *et al.*, 2013). En el caso de las gatas se trata del tercer tumor más frecuente después de los tumores como el linfoma y los tumores cutáneos (Merlo *et al.*, 2008).

Los carcinomas inflamatorios caninos (CIC), son un tipo de tumor de mama poco frecuente en los seres humanos y animales. En las mujeres representan entre el 1 y 5% de todos los tumores malignos de mama (Van Der Auwera *et al.*, 2006) y

en las perras, la incidencia es en promedio 7,6 % de los tumores mamarios (Peña *et al.*, 2003) mientras que en las gatas solo se han descrito casos aislados (Perez-Alenza *et al.*, 2003; Millanta *et al.*, 2012).

La edad es un factor importante en el desarrollo de estos tumores, donde las hembras geriátricas de cualquiera de las especies son más propensas a desarrollar estos tumores. La edad media de aparición de las neoplasias mamarias en perras oscila entre los 10 y 11 años (Egenval *et al.*, 2005; Sorenmo *et al.*, 2012), considerandose infrecuentes antes de los 2 años de edad (Gruntzig *et al.*, 2015). Los tumores de mama afectan principalmente a las gatas de mediana edad o geriátricas, con un promedio de entre 10 y 12 años (Morris 2013) y un grado de malignidad mayor (Morris 2013; Sorenmo *et al.*, 2012). La aparición de tumores malignos antes de los 5 años de edad es poco frecuente salvo que las gatas hayan sido tratadas con hormonas exógenas (Sorenmo *et al.*, 2009). En el caso de las gatas también hay que tener en cuenta que las lesiones benignas son mucho más frecuentes en animales jóvenes, como por ejemplo la fibroadenomatosis mamaria (Misdorp *et al.*, 1999).

La influencia hormonal es también un factor de riesgo para el desarrollo de estos tumores, sobretodo la exposición a las hormonas ováricas durante los 2 primeros años de vida (Sorenmo *et al.*, 2009). Las hormonas esteroideas, estradiol y progesterona, cumplen un papel fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria normal por lo que si se produce un descontrol en la secreción hormonal se pierde la homeostasis celular, facilitando en algunos casos la carcinogénesis (Van Garderen *et al.*, 2002). El tejido glandular mamario normal contiene tanto receptores de estrógenos como de progesterona, similar a lo observado en muestras de tejidos displásicos o tumores benignos en perras con un 95-100% de expresión de ambos receptores. Sin embargo, en los casos de carcinomas no ocurre lo mismo, con solo un 50% de expresión de receptores de estrógenos y un 71% de progesterona (Mainenti *et al.*, 2014).

Dada la importancia de las hormonas como factor predisponente, la ovariectomía (OHE) disminuye en gran medida el riesgo de tumores mamarios en ambas especies (Sorenmo *et al.*, 2000; Overley *et al.*, 2005). Es por eso que la incidencia varía mucho entre países en función de las diferentes políticas de castración, siendo mucho más elevada en España en comparación con otros países donde la práctica de la OHE en perras jóvenes es común (Borrego 2016).

Las perras esterilizadas antes de su primer celo tienen un riesgo de padecer estos tumores de un 0,5%; después del primer estro, el riesgo sube al 8%, y después de su segundo estro, se eleva al 26% (Sorenmo *et al.*, 2000). Después del tercer estro la OHE solo proporciona una protección modesta. Sin embargo, los estudios más recientes muestran un menor riesgo de desarrollar nuevos tumores si la OHE se realiza al mismo tiempo que la extirpación de tumores benignos, lo que sugiere el efecto continuo de las hormonas durante toda la vida del animal (Kristiansen *et al.*, 2013). La castración de los pacientes felinos antes del primer estro proporciona una reducción del riesgo de padecer tumores del 91%; antes del segundo estro, una reducción del riesgo del 86%; y antes del tercer estro, una reducción del riesgo del 11%. Después de los 2 años de edad, no se han descrito beneficios asociados a una intervención quirúrgica (Overley *et al.*, 2005).

El uso de progestágenos que suprimen el celo promueve cambios hiperplásicos en la glándula mamaria. Existe controversia con respecto al uso de estos progestágenos y su relación con el desarrollo de tumores mamarios. Algunos autores describen que la administración prolongada de estos productos no aumenta la incidencia de neoplasias malignas, aunque si la de benignas (Borrego 2016), sin embargo, hay estudios que describen la existencia de una relación entre la administración de progestágenos y el desarrollo de tumores tanto benignos como malignos (Sorenmo *et al.*, 2012).

A pesar de que los tumores mamarios pueden afectar a perros y gatos de cualquier raza, aquellas que parecen presentar un mayor riesgo incluyen la raza Siamés en gatos, Caniches, Perros de Aguas, Cocker Inglés, Brittany Spaniels, Setter inglés, y Pastores Alemanes; Por el contrario, parece que hay algunas razas que tienen un menor riesgo en el desarrollo de tumores mamarios como son los Collie, Shetland Sheepdog y los Pastores de Berna (Sorenmo *et al.*, 2011). Algunos estudios apuntan que la incidencia de tumores mamarios malignos es mayor en razas grandes con respecto a las razas pequeñas. Así, el 58% de las razas grandes tienen tumores mamarios histológicamente malignos, comparado con el 25% de los pacientes de razas pequeñas, por lo que es el doble de probable que un tumor de mama sea maligno en una raza grande que en una pequeña (Itoh *et al.*, 2005). Todos estos estudios sugieren que el riesgo de tumores mamarios está asociado a determinados tipos de razas y que, por tanto, exista un marcado componente genético (Sorenmo *et al.*, 2012).

Otro de los factores que podría estar relacionado con un aumento de riesgo de desarrollar tumores mamarios en perras es la dieta y la conformación física, de manera que las perras que son delgadas durante el primer año de vida tienen menor riesgo de padecer neoplasias mamarias que aquellos que son obesos. Se ha descrito que el efecto de la obesidad en el posible desarrollo de tumores mamarios tiene un mayor efecto cuando dicha obesidad o la ingesta de una dieta rica en grasa o en carne roja ocurre durante los primeros meses de vida del animal. Sin embargo, que el paciente sea obeso cercano al momento de desarrollo de la neoplasia mamaria parece no tener tanta relevancia. Puede que el efecto de la obesidad sea similar al efecto de las hormonas sexuales que tienen una mayor influencia durante el desarrollo mamario (Sorenmo *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2015a, 2015b).

2.2 Patología y comportamiento biológico de los tumores mamarios

En los perros cerca del 60% de los tumores mamarios son benignos (Goldsmicht *et al.*, 2011), siendo los más frecuentes los fibroadenomas (tumor mixto benigno). Los tipos más comunes de tumores malignos en los perros son carcinomas sólidos, seguidos por adenocarcinomas tubulares, un 7.6% de CIC y sólo el 3% son sarcomas (Perez-Alenza *et al.*, 2001). Del 50% que son malignos, 50% recidivarán o metastatizarán (Stratman *et al.*, 2008).

Algunos de los factores pronósticos asociados con una menor supervivencia en perros con tumores mamarios incluyen el tipo histológico (tumores poco diferenciados, sarcoma, y carcinomas inflamatorios (CI) tienen un peor pronóstico), tamaño del tumor superior a 3 cm, la afectación de los ganglios linfáticos, la evidencia histológica de invasión linfática o vascular, esterilización previa, tasa de infiltración de linfocitos en el tumor primario, ulceración, expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona), expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la densidad microvascular, marcadores de proliferación, comportamiento clínico (patrón de crecimiento, fijación, ulceración) y metástasis a distancia (Chang *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2013; Sleecks *et al.*, 2013).

El 80-90% de tumores mamarios felinos son malignos, y más frecuentemente adenocarcinomas (Morris 2013). Son biológicamente agresivos con una tasa elevada de metástasis, sin embargo los tiempos de supervivencia pueden variar significativamente. El tamaño del tumor, estadio de la enfermedad, grado histológico (Seixas *et al.*, 2011), y la extensión de la intervención quirúrgica han demostrado que influyen en el pronóstico (Morris 2013). Los tumores de gran volumen, mayores

de 3 cm se han asociado con tiempos más cortos de supervivencia (4-12 meses) (Macneill *et al.*, 2009; Novosad *et al.*, 2006). El tipo de cirugía realizada, y si esta resección es completa ha demostrado ser pronóstico para el tiempo libre de enfermedad pero no para el tiempo de supervivencia (Morris 2013).

En el caso en particular del CIC se trata de un tumor biológicamente agresivo que presenta un curso rápido y fulminante con supervivencias muy cortas. Además se ha descrito un patrón de metástasis diferente al de otros tumores mamarios no inflamatorios (Clemente *et al.*, 2010). Los CI solo se han descrito en un escaso número de pacientes felinos presentando un mal pronóstico (Perez-Alenza *et al.*, 2003; Millanta *et al.*, 2012).

2.3 Clasificación y presentación clínica de los tumores mamarios

La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporcionó un sistema de clasificación histológica que pudiera ser útil para alcanzar un pronóstico (Misdorp *et al.*, 1999). Esta clasificación ha sido posteriormente modificada por Goldschmidt y colaboradores en el año 2011, proponiendo la clasificación histológica y la nomenclatura de las neoplasias y de las displasias de la glándula mamaria en la especie canina (Goldsmith *et al.*, 2011). Las clasificaciones anteriores no incluían los CIC, al considerar que no se trataba de un subtipo histológico específico, refiriéndose únicamente a un nombre genérico dado a un carcinoma de mama con marcada inflamación (Misdorp *et al.*, 2002). En la nueva clasificación de Goldsmith y colaboradores el CIC ya aparece como una entidad específica.

Con respecto a los gatos, esta especie tiene un sistema de clasificación independiente establecido por la OMS. Este sistema también se basa en la morfología del tumor mamario y su división en cuatro grupos es similar a la de la especie canina (Misdorp *et al.*, 1999). Cabe señalar que en la misma lesión de mama pueden estar presentes zonas histológicas tanto benignas como malignas (Sorenmo *et al.*, 2012).

Las perras tienen 5 pares de mamas, mientras que los gatos tienen 4 pares de mama, siendo todas ellas susceptibles de desarrollar uno o más tumores mamarios malignos o benignos.

En ambas especies, en el examen físico los animales pueden tener nódulos únicos o múltiples asociados con el pezón o la propia glándula. En el caso de las perras las glándulas mamarias caudales son las que se afectan con mayor

frecuencia (65%-75% ocurren en las mamas 4 y 5), probablemente porque existe una mayor cantidad de tejido glandular mamario (Sorenmo *et al.*, 2009). Los tumores felinos ocurren con la misma frecuencia en todas las glándulas (Morris 2013). Las lesiones benignas tienden a ser pequeñas, bien delimitadas, y firmes a la palpación. Por el contrario, algunos de los signos clínicos de malignidad que se han descrito incluyen: crecimiento rápido, márgenes mal definidos, fijación a la piel o a los planos profundos, ulceración o inflamación; sin embargo, cabe destacar que algunos tumores mamarios malignos pueden aparecer no adheridos y bien delimitados (Sorenmo *et al.*, 2012).

2.3.1 Particularidades de la presentación clínica del carcinoma inflamatorio

Este tipo tumoral se presenta con unas características clínicas únicas, generalmente con un aspecto de placa, firme, caliente, eritematoso, y es bastante doloroso. Algunos de estos criterios hacen que se pueda confundir con procesos benignos como mastitis o dermatitis (Perez-Alenza *et al.*, 2001, Marconato *et al.*, 2009). Suele aparecer edema asociado que puede afectar hasta la zona inguinal y las patas traseras, como consecuencia de que el tumor produce una obstrucción de los vasos linfáticos. Además, los CIC presentan un crecimiento particularmente rápido, afectando a múltiples glándulas mamarias y a la piel que cubre el tejido mamario. La región de tejido mamario caudal parece ser la localización más frecuente, con hasta un 70% de los casos localizándose en esa región (Marconato *et al.*, 2009).

Todas las perras con CI suelen presentar los signos clínicos en más de una glándula mamaria y en algunos estudios hasta en un 58% de los casos, existe una afectación de ambas cadenas mamarias (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009). Además, aproximadamente el 60% de los animales muestran signos de edema de extremidad, provocando cojera de la extremidad afectada (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009). Frecuentemente, se observa en la exploración física un aumento del tamaño de los nódulos linfáticos regionales (axilar y/o inguinal) que oscila entre el 27% y 63% de los casos dependiendo del estudio consultado (Perez-Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009).

En la mayoría de los casos, los pacientes que se presentan con este tipo tumoral muestran otros signos clínicos como debilidad, anorexia y dolor (Marconato *et al.*, 2009; Perez-Alenza *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2009).

En perras, los CIC se suelen clasificar en primarios y secundarios siguiendo la clasificación de los carcinomas inflamatorios humanos (CIH). El CIC primario es

aquél que se desarrolla de forma repentina, sin historia previa de tumores mamarios. Este tipo parece más agresivo que el secundario, presentando un crecimiento más rápido. El CIC secundario es aquél que se desarrolla en un animal que ya padecía previamente tumores mamarios en esa zona. Este tipo es ligeramente más común que el primario, aunque menos agresivo. El CIC secundario puede presentarse en pacientes donde existía un tumor mamario no sometido a cirugía, a partir del cual, comienza a desarrollarse un CIC, o en pacientes sometidos a cirugía de un tumor mamario de un tipo histológico diferente y donde aparece una recidiva en la misma zona (Perez-Alenza *et al.*, 2001).

2.4 Diagnóstico de los tumores mamarios

En perras y gatas de edad avanzada, la neoplasia mamaria debe ser la primera patología a considerar cuando se observa un nódulo que afecta al tejido mamario, aunque no se puede descartar que se trate de otro tipo de lesiones benignas como mastitis, galactostasis, galactorrea o una neoplasia de los tejidos adyacentes (p.e mastocitoma, lipoma, carcinoma de células escamosas, etc.). En el proceso diagnóstico inicial es muy importante obtener una historia clínica completa, una exploración física completa y una exploración detallada de todas las glándulas mamarias y ganglios regionales, así como una analítica sanguínea completa (incluyendo hemograma y bioquímica) y un urianálisis, para así determinar el estado general de salud del animal (Borrego 2016).

El examen histopatológico, normalmente realizado a través de la biopsia por escisión de la masa, se considera el método de elección para el diagnóstico de los tumores mamarios. Un paso previo podría ser la realización de una punción con aguja fina (PAF) de la masa y posterior evaluación citológica, y aunque podría ayudar a distinguir las lesiones benignas de malignas (sensibilidad entre 79-88.6% y especificidad del 73-100% diferenciando entre ambos) sigue siendo necesaria la histopatología, debido a la posible subestimación del potencial maligno del tumor (Sontas *et al.*, 2012). La citología es más útil para descartar otros tipos tumorales que se desarrollen en la zona de las mamas, la detección de metástasis ganglionar locorregional, y en aquellos casos donde se sospecha extensión dérmica y embolias neoplásicas dentro de los vasos linfáticos dérmicos (tumores de mama agresivos o CI). Las biopsias incisionales son muy útiles para determinar el tipo de tumor mamario pero no se utilizan de forma común ya que no suelen cambiar el tipo de intervención quirúrgica a realizar (Borrego 2016).

En la actualidad, el diagnóstico de CIC se basa en la presencia de sus características clínicas (Susaneck *et al.*, 1983) y estudio histopatológico, basándose en una característica exclusiva de este tipo tumoral, que es la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial (Perez-Alenza *et al.*, 2001). La PAF de la mama o de la piel de zonas representativas de induración generalizada, edema o enrojecimiento, suelen ayudar en el diagnóstico. Se recomienda extremar la precaución a la hora de tomar biopsias incisionales de estos pacientes ya que se han descrito anomalías en la coagulación (Susaneck *et al.*, 1983; Perez-Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009).

2.5 Estadio clínico de los tumores mamarios

La diseminación metastásica en los tumores mamarios malignos se produce a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos regionales o por vía hematogena, siendo los pulmones el sitio más frecuente de metástasis a distancia (Sorenmo *et al.*, 2011). Se requiere una evaluación histopatológica de los ganglios linfáticos para diagnosticar definitivamente metástasis/micrometástasis (Matos *et al.*). Las radiografías torácicas son importantes para evaluar la presencia de enfermedad metastásica pulmonar o derrame pleural, que aparece frecuentemente en gatas (Morris 2013). La ecografía es un componente de la estadificación exhaustiva con el fin de evaluar la posible extensión locorregional (ganglio inguinal superficial, los ganglios linfáticos axilares) o linfadenopatía metastásica intraabdominal, especialmente en aquellos casos en que los tumores de mama se localizan en las glándulas mamarias caudales y/o que presenten factores pronósticos negativos (Borrego 2016). La sospecha ecográfica de metástasis debe confirmarse preferentemente mediante análisis citológico de una PAF ecoguiada. Se ha descrito la realización de ecografía de la masa mamaria, sin embargo la correlación entre los cambios histopatológicos y el diagnóstico de malignidad varía entre estudios (Nyman *et al.*, 2006; Feliciano *et al.*, 2012).

2.6 Tratamiento de los tumores mamarios

2.6.1 Cirugía

La cirugía es la base del tratamiento de los tumores mamarios en perros y gatos. alguna de las contraindicaciones importantes a la hora de realizar una cirugía con intento curativo es el diagnóstico de metástasis, o los CIC, ya que es

prácticamente imposible eliminar todo el tumor, y la recidiva puede ocurrir a los pocos días de la cirugía (Marconato *et al.*, 2009).

En perras con otro tipo de tumores mamarios diferentes al CIC, el objetivo de la cirugía es extirpar todo el tumor mediante el procedimiento más simple posible, considerando el drenaje linfático normal de las glándulas afectadas. No hay un criterio único acerca de si se debe realizar cirugías conservadoras o radicales (Stratman *et al.*, 2008). Los defensores de la mastectomía radical argumentan que reduce el riesgo futuro de aparición de una nueva neoplasia mediante la disminución del volumen de tejido mamario, apoyados por literatura reciente donde aquellas perras que se sometían a una mastectomía regional un 58% de ellas desarrollan otro tumor en las mamas restantes de dicha cadena (Stratman *et al.*, 2008). Los autores que abogan por cirugías más conservadoras argumentan que la tasa de tumores mamarios benignos es de más de un 50% y que realizar cirugías extensas puede ser innecesario en muchos casos, aumentando también los costes y el tiempo de recuperación de los pacientes (Sorenmo *et al.*, 2012). Además no existen estudios que demuestren supervivencias más prolongadas en pacientes que se someten a cirugías más agresivas (Stratman *et al.*, 2008). Si las masas están presentes en múltiples glándulas, pueden ser extirpadas individualmente o en una mastectomía en cadena, de nuevo la elección de la cirugía se realiza sobre la base de la forma más fácil de eliminar todo el tejido afectado. En resumen, la elección del procedimiento quirúrgico más adecuado debe de ser individualizada para cada paciente y estar determinada por el drenaje linfático del tumor/es, su grado de infiltración en los tejidos adyacentes, la probabilidad de lograr un control local de la enfermedad, así como la recuperación del paciente (Sorenmo *et al.* 2009., Borrego 2016).

Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de tumores mamarios caninos se pueden curar con la cirugía como único tratamiento. En los gatos, debido a las múltiples posibles conexiones vasculares y linfáticas entre glándulas individuales y entre los lados izquierdo y derecho, se recomienda la realización de mastectomías completas unilaterales o bilaterales, incluyendo la fascia subyacente "en bloque" (Morris 2013). La extensión de la cirugía marca una diferencia en los tiempos libres de enfermedad y recidiva (Novosad *et al.*, 2008). En aquellos casos donde se realice una mastectomía bilateral se recomienda un mínimo de 2 semanas de intervalo entre cirugías. El ganglio linfático inguinal debe ser siempre extirpado con la glándula mamaria, mientras que los ganglios linfáticos axilares sólo se extirpan si están aumentados de tamaño (Borrego 2016).

Hasta la fecha la evidencia científica sobre el efecto protector de la OHE realizada al mismo tiempo que la cirugía de tumores mamarios en el riesgo de desarrollo de futuros tumores, era demasiado débil para concluir con firmeza si se debe realizar la intervención o no. Un reciente estudio randomizado y controlado demuestra que la realización de la OHE en el momento de la extirpación del tumor reduce el riesgo de aparición de tumores mamarios futuros en un 47% en las perras con tumores mamarios no malignos, si bien no aumentó la supervivencia específica relacionada con dichos tumores (Kristiansen *et al.*, 2013).

Además, es importante tener en cuenta que la OHE previene futuras enfermedades de ovario o de útero (Sorenmo *et al.*, 2000; Kristiansen *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2005).

2.6.2 Quimioterapia

Aunque la quimioterapia forma parte del tratamiento del cáncer de mama en mujeres, y a pesar de lo frecuente de esta enfermedad en perras y gatas, hay muy poca información acerca de la eficacia del tratamiento quimioterápico en medicina veterinaria. La mayoría de los tratamientos se consideran en fase experimental, especialmente en aquellos casos en los que se emplea como tratamiento adyuvante después de la cirugía (Sorenmo *et al.*, 2012; Borrego 2016). Las perras con tumores mamarios malignos, y en presencia de factores pronósticos negativos, como por ejemplo enfermedad avanzada localmente o presencia de metástasis, o con un tipo histológico biológicamente agresivo, pueden beneficiarse de un tratamiento adyuvante como la quimioterapia o terapias antiangiogénicas (Borrego 2016).

En perras la quimioterapia ha sido utilizada en la presentación macroscópica en monoterapia o protocolos multifármaco, con resultados modestos y tasas de respuesta alrededor del 20%, siendo los fármacos más comúnmente utilizados la doxorubicina, carboplatino, mitoxantrona, 5-fluorouracilo y ciclofosfamida (Sorenmo *et al.*, 2012; Borrego 2016). La utilización de taxanos, fármacos ampliamente utilizados en medicina humana, en tumores mamarios caninos ha vuelto a generar interés gracias a que recientemente se ha desarrollado una nueva formulación de paclitaxel para perros que ha conseguido evitar las reacciones alérgicas tan comunes que presentaba este fármaco (Khanna *et al.*, 2015). Los estudios en la presentación microscópica adyuvante, después de la cirugía, han sido poco concluyentes incluyéndose muy pocos pacientes (Simon *et al.*, 2006; Marconato *et al.*, 2008; Lavalle *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2014).

En los CIC habitualmente se administran tratamiento paliativos que incluyan analgesia, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticosteroides y tratamiento con antibióticos, siendo escasos los estudios describiendo la utilización de la quimioterapia tradicional citotóxica con pronósticos en general muy pobres (Marconato *et al.*, 2009; Clemente *et al.*, 2009).

En pacientes felinos a pesar de llevar a cabo la cirugía, son muchos los pacientes que mueren a causa de la enfermedad. Este hecho, sumado a las elevadas tasas de metástasis hacen que se recomiende combinar la cirugía con quimioterapia adyuvante (de Campos *et al.*, 2014). El fármaco más comúnmente utilizado es la doxorubicina, basándose en tres estudios donde se utilizó en enfermedad macroscópica combinada en algunos casos con ciclofosfamida, obteniendo respuestas en el 50% de los tumores inoperables o en estadio IV (Jeglum *et al.*, 1985; Mauldin *et al.*, 1988; Stolwijk *et al.*, 1989). Más recientemente se ha evaluado la eficacia de docetaxel en la presentación macroscópica de los tumores mamarios felinos demostrando una eficacia biológica del 26.6% y un beneficio clínico del 59% (Escriche *et al.*, 2014). Los estudios llevados a cabo en su presentación microscópica, habitualmente retrospectivos no han podido determinar su beneficio clínico sobre las supervivencias obtenidas con solo el tratamiento quirúrgico (Novosad *et al.*, 2008; Borrego *et al.*, 2009).

3

PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS Y LA INFLAMACIÓN EN LOS TUMORES MAMARIOS

3.1 Prostaglandinas y ciclooxigenasas

El precursor de la prostaglandina, el ácido araquidónico, es un ácido graso poliinsaturado que forma parte de fosfolípidos de las membranas de las células. Tras su liberación de la membrana, a través de las fosfolipasas A2 o diacilglicerol lipasa, se produce su oxidación a través de dos rutas:

- Vía de la lipoxigenasa, cuyos productos principales son leucotrienos y lipoxinas.
- Vía de la ciclooxigenasa (COX), cuyos productos principales son prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos.

Se han caracterizado dos isoformas: COX-1 y COX-2. La isoforma COX-1 es constitutiva en todos los tejidos especialmente en riñón y el tubo gastrointestinal. Participa en la producción de prostaglandinas (PG) que intervienen en procesos fisiológicos tales como: protección del epitelio gástrico, mantenimiento del flujo renal, la agregación plaquetaria, la migración de neutrófilos y también se expresan en el endotelio vascular (Singh Ranger 2016). La isoforma COX-2 tiene como función mediar en los procesos de inflamación y en la señalización por prostanoides. Se expresa tras inducción inflamatoria, aunque es constitutiva en el sistema nervioso central y riñón. La expresión de la COX-2 es provocada por diversos mediadores inflamatorios (interferón γ , factor de necrosis tumoral α , interleucina 1, factores de crecimiento entre otros) en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales) y tejidos (aparato reproductor, sistema nervioso central, estómago, riñón, pulmón y ciertos tejidos afectados por procesos neoplásicos) (Singh Ranger 2016).

Tanto COX-1 como COX-2 oxidan el ácido araquidónico, dando lugar a la prostaglandina G₂ (PGG₂), para posteriormente formar la prostaglandina H₂ (PGH₂) (Vane *et al.*, 1998). Finalmente otras enzimas utilizan la PGH₂ como sustrato para sintetizar una variedad de moléculas prostanoides, principalmente prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) y tromboxano (TXA).

3.2 Papel de COX-2 en el cáncer

El papel de las enzimas COX en cáncer es complejo y, a menudo multifacético. Numerosos tipos de células inflamatorias y del microambiente tumoral pueden expresar COX-2 en respuesta a mitógenos, (Jones *et al.*, 2000; Mohammed *et al.*, 2004). La producción de PGE₂ se asocia a pasos vitales en el proceso de la carcinogénesis (Harris *et al.*, 2014; Greenhough *et al.*, 2009). La evidencia acumulada sugiere el papel de la COX-2 en el desarrollo y progresión del tumor tanto en el cáncer humano y canino (Dore *et al.*, 2011). Al igual que en medicina humana la sobreexpresión de COX-2 se ha descrito en multitud de tumores en perros como son los tumores mamarios, además de los carcinomas de células transicionales, carcinoma prostático, carcinoma de células escamosas, tumores intestinales, tumores nasales, carcinomas renales, carcinomas ováricos, melanomas orales, osteosarcomas, y meningiomas (Brunelle *et al.*, 2006; Dore *et al.*, 2011).

3.2.1 COX-2 y su relación con el cáncer de mama

Tras el cáncer colorectal, los tumores de pecho son el tipo de tumor donde más se ha estudiado la influencia de COX-2. Aproximadamente el 40-50% de los carcinomas invasivos de mama presentan niveles de proteína COX-2 elevados (Denkert *et al.*, 2003; Soslow *et al.*, 2000) y la expresión de COX-2 en tumores humanos se ha asociado con una disminución de los tiempos libres de enfermedad (TLE) (Denkert *et al.*, 2003; O'Connor *et al.*, 2004; Ristimaki *et al.*, 2002). Del mismo modo varios estudios han demostrado una asociación entre la expresión de COX-2 y el desarrollo de metástasis a distancia, angiogénesis, peor pronóstico y períodos de supervivencia más cortos en los tumores mamarios caninos (Queiroga *et al.*, 2005; Lavalle *et al.*, 2012).

Similar a los hallazgos en el cáncer de mama en humanos, el aumento de la expresión de COX-2 en perras tiende a asociarse a una malignidad creciente de los tumores mamarios con un aumento de la expresión en los malignos (56%) en comparación a los benignos (24%) (Dore *et al.*, 2003). Posteriormente otros estudios han descrito porcentajes de expresión que varían entre un 42% y hasta un 100% de los tumores mamarios malignos analizados (Dore *et al.*, 2011). Sin embargo la expresión de COX-2 se ha demostrado que es débil o incluso ausente en el tejido de la glándula mamaria normal y si lo hace suele ser con una localización membranosa en contraste con la distribución citoplásmica de COX-2 en las células cancerosas (Lavalle *et al.*, 2009).

Además parece que la expresión de COX-2 pueda estar asociada al tipo histológico siendo los tumores tubulopapilares, anaplásicos, carcinomas de células escamosas, así como carcinosarcomas los que expresan COX-2 de manera más frecuente (Heller *et al.*, 2005; Queiroga *et al.*, 2005, 2007). Las células metastásicas locoregionales y a distancia de cáncer de mama también sobreexpresan COX-2, con una intensidad de expresión de COX-2 similar o más intensa que el tumor primario (Días Pereira *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2016). Además las células neoplásicas que infiltran el estroma de la glándula mamaria y aquellas que se encuentran en los émbolos tumorales en vasos linfáticos expresan COX-2 con una mayor intensidad pudiendo implicar un papel en la migración celular y la movilidad (Clemente *et al.*, 2013). La angiogénesis en estos tumores parece que también pudiese estar modulada por COX-2 ya que se ha demostrado una asociación entre el Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y COX-2 en los tumores mamarios malignos (Dias Pereira *et al.*, 2009; Queiroga *et al.*, 2011; Clemente *et al.*, 2013).

Recientes estudios demuestran el papel de COX-2 como marcador de células madre en determinados tumores así como su función en la capacidad de autorenovación y mantenimiento de células madre tumorales facilitando la iniciación de los tumores mamarios (Huang *et al.*, 2015; Thanan *et al.*, 2012).

3.2.2 COX-2 y la angiogénesis en el carcinoma inflamatorio canino

De forma similar a lo que ocurre en el carcinoma inflamatorio humano (CIH), COX-2 se encuentra sobreexpresado en los tumores mamarios caninos (Queiroga *et al.*, 2005; Vermuelen *et al.*, 2010).

Además los CIC y los CIH muestran niveles más altos de otros factores angiogénicos y linfangiogénicos así como sus receptores, en comparación con otros tumores de mama definiendo su fenotipo invasivo y angiogénico. Tanto el CIC como el CIH se caracterizan por la gran vascularización y el aumento de la densidad microvascular debido a la alta expresión de factores angiogénicos como VEGF. Esta es una de las similitudes que han propuesto a los CIC como un buen modelo natural para el estudio de los CIH (Clemente *et al.*, 2013; Robertson *et al.*, 2010).

Varios grupos han descrito una correlación positiva entre la expresión de COX-2 y VEGF tanto en CIH como en CIC (Queiroga *et al.*, 2011; Kirpratrack *et al.*, 2002; Raposo *et al.*, 2016). La familia de proteínas VEGF se relaciona tanto con la angiogénesis mediante el factor VEGF-A como con la linfangiogénesis, mediante el factor VEGF-D (Van der Auwera *et al.*, 2006). En casos de CIC se ha descrito una asociación de COX-2 con VEGF-D y VEGFR-3 (receptor de VEGF-D) pudiendo ser responsable de la marcada linfangiogénesis de este tipo específico de neoplasia mamaria (Clemente *et al.*, 2013). Además, la expresión de COX-2 y VEGF se han asociado al pronóstico en CIC y CIH (Vermuelen *et al.*, 2010; Clemente *et al.*, 2013; Raposo *et al.*, 2016).

VEGF no solo juega un papel importante en la angiogénesis de los CIC si no que se asocia a un peor pronóstico en pacientes con CIH y está sobreexpresado en pacientes con CIC comparado con aquellos tumores de mama no CI. (Raposo *et al.*, 2016, Millanta *et al.*, 2006; Arias pulido *et al.*, 2012; Camacho *et al.*, 2014) por lo que se considera una diana en el tratamiento de esta enfermedad tanto en CIC como CIH.

La caracterización de una línea celular de CIC (IPC-366) donde más del 90% fueron positivos a COX-2 confirma las características angiogénicas de esta enfermedad. Además se demuestra que COX-2 puede representar un marcador de

la células endoteliales implicadas en el fenómeno de mimetismo vascular tan característico de esta enfermedad (Clemente *et al.*, 2010, 2013).

3.2.3 Uso de inhibidores COX-2 en el tratamiento del cáncer

Los estudios clínicos y epidemiológicos en medicina humana sugieren que el uso a largo plazo de AINEs, en particular los inhibidores altamente selectivos de COX-2, están vinculados a una menor incidencia de varios tipos de neoplasias epiteliales, como son los carcinomas de colon, mama, gástricos y esofágicos (Yiannakopoulou *et al.*, 2015; Ranger *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2003). Además los inhibidores de la COX-2 se han utilizado con éxito como parte de protocolos metronómicos para el tratamiento de cáncer de mama avanzado y gliomas (Perroud *et al.*, 2016; Kerschbaumer *et al.*, 2015). Esto los convierte en una estrategia preventiva y terapéutica para múltiples tipos de tumores en personas (Ghosh *et al.*, 2010).

Estudios epidemiológicos similares a los realizados en humana y ensayos de control aleatorios son muy infrecuentes en animales. Sin embargo, diversos estudios *in vitro* sugieren que la utilización de fármacos inhibidores de COX-2 resultan en una capacidad antineoplásica en diversas líneas celulares (Knottenbelt *et al.*, 2006) y en diversos tipos tumorales *in vivo* como por ejemplo los carcinomas de células transicionales de vejiga, carcinomas de células escamosas y CIC (Dore *et al.*, 2011, Mohammed *et al.*, 2002, 2004; Schmidt *et al.*, 2001; Sorenmo *et al.*, 2004).

Los AINEs se asocian con diferentes niveles de inhibición de las dos isoformas de la COX y, por esta razón, pueden inducir efectos adversos en animales, que incluyen irritación gástrica, el desarrollo de enteropatía perdedora de proteínas, daño renal, y prolongación del tiempo de sangrado (Lascelles *et al.*, 2005a y b; Luna *et al.*, 2007; Mansa *et al.*, 2007). Se cree que los AINEs que están aprobados en veterinaria como inhibidores preferenciales y selectivos de la COX-2 podrían estar asociados con un menor número de eventos adversos (Monteiro-Steagall *et al.*, 2013). Sin embargo, estos nuevos fármacos, aunque más seguros aún pueden producir entre otros efectos secundarios, daño gastrointestinal.

3.2.4 Uso de inhibidores COX-2 en tumores mamarios caninos

Al igual que en medicina humana donde se han utilizado distintas aproximaciones experimentales para demostrar la eficacia quimiopreventiva de AINEs y e inhibores altamente selectivos de COX-2 para reducir el cáncer de mama (Kubatka *et al.*, 2003; Lanza-Jacoby *et al.*, 2003), en medicina veterinaria se han

realizado tanto estudios *in vitro* como *in vivo* para evaluar la eficacia de dichos tratamientos.

Así, se han publicado varios estudios demostrando la inhibición celular de los carcinomas mamarios caninos *in vitro* usando AINEs, tanto no selectivos como preferenciales de COX-2. El uso de piroxicam ha demostrado que inhibe la proliferación celular del carcinoma mamario canino *in vitro* (Knottenbelt *et al.*, 2006). Otro compuesto inhibidor selectivo de COX-2, NS-398, inhibió la proliferación de células de tumor mamario canino así como la producción de PGE2 (Brunelle *et al.*, 2006). Del mismo modo Saito y Colaboradores demostraron que celecoxib induce apoptosis en otra línea celular de carcinoma mamario canino, asociándose con una disminución de los valores de expresión de COX-2 (Saito *et al.*, 2014). Finalmente, otro estudio evaluó el crecimiento de una línea celular mamaria neoplásica canina (CMT-9) en ratones demostrando que la administración de piroxicam, pero no deracoxib, redujo el crecimiento tumoral (Sonzogni-Desautels *et al.*, 2011). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que los inhibidores de COX-2 puedan ser agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de tumores mamarios caninos que sobreexpresen COX-2.

A pesar de los múltiples modelos utilizados existe poca información publicada sobre el uso de AINEs para el tratamiento de cáncer de mama en los perros. En uno de los primeros estudios evaluando la eficacia de piroxicam, AINE no selectivo en un grupo de pacientes con diversos tumores, uno de los tres perros con carcinoma mamario tratados obtuvo una remisión (Knapp *et al.*, 1992).

En los CIC el uso de AINEs es bastante habitual incluyéndose en el manejo paliativo de la enfermedad y terapia analgésica. Doce perros con CI tratados con piroxicam mejoraron su calidad de vida comparado con los que recibieron doxorubicina (De Souza *et al.*, 2009). Otro estudio evaluó el tratamiento quimioterápico versus paliativo en CIC. En el grupo de tratamiento paliativo 9 de 23 perros recibieron piroxicam sin haber respuesta al tratamiento (Clemente *et al.*, 2009). Otro estudio evaluó varios protocolos en 43 casos de CIC donde 18 de 23 casos recibieron solo piroxicam. El tratamiento se toleró bien, sin embargo no se describieron respuestas al tratamiento ni a la supervivencia de este grupo (Marconato *et al.*, 2009).

Los inhibidores COX-2 también se han utilizado en tumores mamarios no CI. Uno de los estudios evaluó de forma retrospectiva la combinación de piroxicam/firocoxib con carboplatino con resultados que sugieren un aumento de la

supervivencia comparado con el grupo de solo cirugía aunque el bajo número de casos en cada grupo, y el hecho de que se trate de un estudio retrospectivo hace difícil extrapolar esos resultados a la población general (Lavalle *et al.*, 2012). Recientemente un estudio de Arenas y Colaboradores evaluó por primera vez de manera prospectiva en veterinaria el uso de un AINE con mayor especificidad por COX-2, como es el firocoxib, como agente único en comparación con el uso solo de quimioterapia (mitoxantrona) en pacientes con tumores mamarios altamente malignos. El grupo de firocoxib obtuvo un tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad (TLE) mayores que el grupo control solo con cirugía, aunque de nuevo se trata de grupos con un número de casos demasiado pequeños para extrapolarse a la población general (Arenas *et al.*, 2016).

Todos estos datos indican que la COX-2 juega un papel importante en la iniciación y promoción de tumores de mama y el mantenimiento del fenotipo maligno de tumores mamarios tanto en mujeres como en perras afectadas por la enfermedad, estableciendo a COX-2 como una posible diana terapéutica en tumores mamarios caninos y humanos (Queiroga *et al.*, 2011).

4

INHIBIDORES TIROSÍN QUINASA Y SU UTILIZACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LOS TUMORES MAMARIOS

4.1 Receptores tirosín quinasa

Los receptores de membrana tirosín quinasa (RTQ) juegan un papel crucial en la transducción celular, actuando como reguladores de procesos críticos como son el crecimiento y la diferenciación celular. Generalmente los RTQ se activan tras la unión del ligando, permitiendo la oligomerización de dos o más dominios. La unión de los ligandos permite la autofosforilación de residuos tirosina situados en la cara interna de la membrana celular comenzando a continuación la cascada de transmisión de señales al núcleo. Este proceso es activado de forma general por factores de crecimiento (FC) o estímulos similares (Manning *et al.*, 2002). Cada RTQ contiene un dominio extracelular que se une al FC, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico quinasa que regula positiva o negativamente la fosforilación del RTQ (London *et al.*, 2014).

4.2 Papel de los receptores tirosín quinasa en cáncer

La señalización a través de RTQ es crítica a la hora de regular diferentes funciones celulares. La desregulación de la actividad quinasa es un mecanismo común en las células cancerígenas por el que escapan de las limitaciones fisiológicas en el crecimiento y la supervivencia. La consecuencia es la señalización persistente que induce la proliferación incontrolada y la supervivencia de las células. Por este motivo, son numerosos los estudios realizados acerca de la actividad y regulación de los RTQ como posible diana terapéutica para el tratamiento del cáncer (Gschwind *et al.*, 2004; Corless *et al.*, 2011).

Uno de los procesos donde los RTQ juegan un papel importante es a la hora de regular la angiogénesis, un proceso esencial para el crecimiento continuado de las células tumorales. Los receptores involucrados en la angiogénesis incluyen el receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), Tie-1 and Tie-2 (receptores de la angiopoyetina) (Thurston *et al.*, 2004; London 2009). Los VEGFR se expresan en el endotelio vascular y su señalización modula la migración y proliferación endotelial (London 2009; Thurston *et al.*, 2004). El PDGFR expresado en el estroma y pericitos también juega un papel clave en la angiogénesis induciendo la síntesis y secreción de VEGF (London 2009). Esta activación paracrina de los VEGFR y PDGFR estromales es importante ya que estimula la angiogénesis y la activación de fibroblastos que ayuda a la progresión tumoral (Bhowmick *et al.*, 2004; Ferrara *et al.*, 2005).

Las disfunciones de los RTQ se han estudiado ampliamente en medicina humana, habiéndose descrito diferentes mecanismos de expresión o activación aberrante que incluyen sobreexpresión, señalización autocrina, mutaciones genéticas y reordenaciones (Gschwind *et al.*, 2004). En perros, a pesar de no estar tan descritos estos mecanismos, varios artículos han demostrado la presencia de mutaciones de la proteína tirosín quinasa Kit que resultan en señalización descontrolada en los mastocitomas (MCT) (Zemke *et al.*, 2001; London *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Downing *et al.*, 2002). Estas mutaciones además se han asociado a tumores de alto grado, un peor pronóstico y a un mayor riesgo de recidiva y enfermedad metastásica (Zemke *et al.*, 2002; Downing *et al.*, 2002; London *et al.*, 1999). Al igual que en humanos, también se han descrito mutaciones de la proteína tirosín quinasa Kit en los perros con tumores del estroma gastrointestinal (Demetri *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2003).

En el caso de los gatos, un estudio realizado en líneas celulares de sarcomas asociados al punto de inyección, sugiere que el PDGFR promueve el crecimiento y supervivencia de estas células (Lawrence *et al.*, 2012). Así mismo se han descrito mutaciones en la proteína tirosín quinasa KIT en los pacientes felinos con MCT, por lo que en ambos casos se considera que pueden ser dianas para la intervención con terapias dirigidas con inhibidores tirosín quinasa (ITQ) (Isotani *et al.*, 2006, 2010; Dank *et al.*, 2002; Bonkovara *et al.*, 2015; Sabattini *et al.*, 2013).

4.3 Inhibidores tirosín quinasa en medicina veterinaria.

La aprobación de imatinib (Gleevec, Novartis) por la FDA en 2001 para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica no sólo supuso un gran avance en el tratamiento del cáncer, sino que también ha permitido futuras investigaciones en el campo de los ITQ. Desde entonces y hasta julio de 2015, un total de 28 ITQ han sido aprobados por la Agencia Europea de Medicamentos y la FDA para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer humano (principalmente en cáncer de pulmón de células no pequeñas, GIST, carcinoma de células renales, leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda). Además de los aprobados, son muchos los ITQ en fase de estudios clínicos y en proceso de aprobación por la FDA (Wu *et al.*, 2016). A pesar de que los ITQ se usan de forma habitual en medicina humana, su aplicación en oncología veterinaria es relativamente reciente. Aún así han demostrado una gran eficacia clínica como monoterapia o en combinación con otros agentes quimioterápicos (Pellin *et al.*, 2016).

En medicina veterinaria, la primera vez que se estableció la relación entre una diana específica de cáncer, su modulación con una molécula y el beneficio clínico fue en perros con cáncer. Este ensayo clínico fase I exploró la seguridad y la eficacia de un nuevo ITQ (SU11654) en perros (London *et al.*, 2003). Esta molécula bloquea varios RTQ expresados en la superficie celular actuando como un inhibidor competitivo y reversible de la unión del adenosin trifosfato (ATP). El perfil inhibitorio de la molécula incluye los receptores de VEGF2, VEGF3, PDGF α/β , Kit, receptor del factor estimulante de las colonias 1 (CSF1R), o receptor tirosín quinasa FLT-3. En el primer estudio en 57 perros y una variedad de histologías tumorales, se detectaron respuestas objetivas en 16 perros, incluyendo 6 respuestas completas (RC), 10 respuestas parciales (RP) y 15 enfermedades estables (EE). Principalmente respondieron pacientes con MCT, pero algunas de las histologías que también

respondieron fueron sarcomas, carcinomas, melanomas y mielomas (London *et al.*, 2003).

A este estudio le siguió el primer estudio de modulación de su tipo realizado hasta ese momento tanto en medicina humana como veterinaria en el que se pudo establecer una asociación directa entre el nivel sanguíneo de un ITQ, el SU11654 y la inhibición real de la diana específica *in vivo* así como una respuesta antitumoral. Un compuesto relacionado con SU11654, el malato de sunitinib (SU11248), fármaco que bloquea la actividad de los mismos RTQ se aprobó en el 2006 por la FDA para el tratamiento del cáncer de riñón y GIST en humanos (Favre *et al.*, 2006).

Hasta la fecha la FDA ha aprobado dos inhibidores de molécula pequeña para su uso en los pacientes caninos: fosfato de toceranib (Palladia®) aprobado para el uso en MCT recidivantes, no quirúrgicos de grado II/III (London *et al.*, 2009); y masitinib (Masivet®, Kinavet®; A), aprobado para su uso en MCT no quirúrgicos de grado II/III con mutación de KIT (Hahn *et al.*, 2008).

4.4 Utilización del fosfato de toceranib en tumores caninos

La FDA aprobó el uso de la molécula SU11654 comercializándose como fosfato de toceranib (Palladia®) basándose en un estudio de campo doble ciego randomizado con 145 casos de MCT no extirpables grado II-III y una tasa de respuesta del 42.8%. La dosis utilizada fue de 3.25 mg/kg/48 h vía oral. A pesar de que el fármaco solo está comercializado para su uso en MCT con ese tipo de presentación, también ha demostrado actividad biológica frente a otros tumores como carcinomas, melanomas y mielomas (London *et al.*, 2003, 2012). El mecanismo de acción del fosfato de toceranib en tumores sólidos no MCT no ha sido establecido en su totalidad, pudiéndose deber a inhibición de la angiogénesis (vía los receptores de las familias VEGF y PDGF), la eficacia antitumoral (vía la inhibición de los RTQ c-kit y FLT-3) o la combinación de ambos mecanismos de acción (London *et al.*, 2012, 2014). Nuevos resultados del grupo de la Dra London y Colaboradores demuestran que el fosfato de toceranib también inhibe el RTQ RET, y posiblemente miembros de la familia de receptores de la quinasa Janus (JAK) (Urie *et al.*, 2012).

En base a los anteriores resultados y a la utilización masiva por parte de los oncólogos veterinarios fuera de las indicaciones del prospecto en otros tumores no MCT, se realizó un estudio retrospectivo evaluando las respuestas en otros tumores sólidos, donde se detectó un beneficio clínico en el 74% de los casos tratados. En

concreto se observaron respuestas en carcinomas de sacos anales, osteosarcomas, carcinomas tiroideos, carcinomas de cabeza y cuello, y carcinomas nasales. Los pacientes en donde se demostró beneficio clínico el fosfato de toceranib se administraba a una dosis media de 2.8 mg/kg que en más de la mitad de los casos (58.7%) se administraba 3 veces por semana en vez de cada 48 h (London *et al.*, 2012).

Un reciente estudio ha evaluado 19 casos de tumores de base cardíaca tratados con fosfato de toceranib donde el 68% tuvieron una mejoría de síntomas clínicos (menor ascitis, tos y disnea). El tiempo medio hasta la progresión de la enfermedad fue de 249 días y la tasa de respuesta incluyendo EE fue de un 52%. (McQuown *et al.*, 2014). Las respuestas observadas en estos tumores muy probablemente son debidas a la inhibición de RET, sobreexpresado en tumores de origen neuroendocrino (Urie *et al.*, 2012). En base a los resultados observados en la clínica diaria, el uso del fosfato de toceranib es en la actualidad ampliamente utilizado como una de las primeras opciones en tumores neuroendocrinos (London *et al.*, 2014; McQuown *et al.*, 2014).

La dosis y efectos adversos del fosfato de toceranib han sido ampliamente descritos en perros a la dosis de 3.25 mg/kg/48 h del prospecto (London *et al.*, 2003, 2012). Los hallazgos del estudio de London y colaboradores en 2012 descrito anteriormente, donde los pacientes respondieron a dosis inferiores a las del prospecto (London *et al.*, 2012) junto con los resultados de un estudio prospectivo realizado por Feo y colaboradores donde también se observaron respuestas en pacientes tratados con dosis entre 2.4 a 2.9 mg/kg/48h (Bernabé *et al.*, 2013) hacen que la dosis recomendada en estos momentos sea de 2.4-2.9 mg/kg tres veces por semana (London *et al.*, 2014). Esta dosis se asocia a una exposición al fármaco considerada suficiente para inhibir el receptor con concentraciones en plasma a las 6-8 h que oscilaban entre 100 y 120 ng/ml, estando además asociada a una menor tasa de efectos secundarios comparado con la dosis del prospecto de 3.25 mg/kg/48 h, sin detectarse efectos adversos grado 3 o 4 según criterios VCOG (Bernabé *et al.*, 2013; VCOG 2011).

En relación a los efectos adversos, el perfil de toxicidad del fosfato de toceranib se conoce bastante bien en perros, siendo muy similares a los efectos secundarios descritos en medicina humana. Así, el tratamiento con sunitinib en humanos suele tolerarse bien en general siendo las reacciones adversas más frecuentes (más del 20% de los pacientes): fatiga, astenia, diarrea, náuseas,

mucositis/estomatitis, vómitos, dispepsia, dolor abdominal, estreñimiento, hipertensión, erupción cutánea, síndrome mano-pie, decoloración de la piel, alteración del gusto, anorexia y sangrado leve. Sus principales toxicidades limitantes de dosis (TLD) son la mielosupresión y la hipertensión arterial sistémica (Faivre *et al.*, 2006; Valle *et al.*, 2014).

En perros los efectos secundarios más comúnmente descritos son los gastrointestinales (anorexia, vómitos, diarrea) y mielosupresión (London *et al.*, 2014; Bernabé *et al.*, 2013). Otros de los efectos secundarios descritos aunque menos frecuentes incluyen hepatotoxicidad, proteinuria y miopatías, reflejando la gran variedad de localizaciones en el cuerpo de las dianas de este fármaco (London *et al.*, 2009). Recientemente un estudio ha demostrado que el tratamiento de fosfato de toceranib se asocia a aumentos significativos de la presión sanguínea. En concreto un 37% de los perros tratados experimentaron presiones ≥ 160 mmHg, un rango que se asocia a un aumento del riesgo de daño a órganos diana y que requiere tratamiento antihipertensivo (Tjostheim *et al.*, 2016).

En resumen, estos efectos secundarios son habitualmente leves a moderados y autolimitantes, aunque en ocasiones requieren detener la administración del fármaco o reducciones de dosis/frecuencia (London *et al.*, 2014) similar a lo realizado en medicina humana donde a pesar de realizar estas reducciones de dosis los pacientes a menudo siguen beneficiándose del tratamiento (Valle *et al.*, 2014).

4.4.1 Fosfato de toceranib en tumores de mama

El uso del fosfato de toceranib para el tratamiento de tumores mamarios caninos no está bien estudiado y solo se ha descrito dentro del estudio fase I del fármaco, donde cuatro de los cinco pacientes con tumores mamarios tuvieron respuestas de más de 10 semanas (London *et al.*, 2003). Un estudio multicéntrico más reciente ha evaluado la respuesta a fosfato de toceranib en tumores mamarios medibles recidivantes o metastásicos en perros. Se incluyeron 38 animales con 1RC, 8RP, 15EE y 14EP. El 21% de perros con tumores mamarios y enfermedad avanzada tuvieron una respuesta clínica considerable con un intervalo libre de progresión de 144 días comparado con 32 días en aquellos que no respondieron (Gattino *et al.*, 2014).

4.4.2 Fosfato de toceranib en tratamientos multimodales

Desde los primeros estudios mencionados anteriormente y que llevaron a la posterior aprobación del fármaco son varios los estudios y publicaciones recientes

apoyando el uso del fosfato de toceranib y demostrando su eficacia en otras patologías y en diferentes protocolos y combinaciones.

✓ **Combinación con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

La utilización de AINEs es necesaria con frecuencia en los pacientes oncológicos para tratar enfermedades concurrentes como la osteoartritis ya que suelen ser pacientes geriátricos (Mansa *et al.*, 2007). Además existe un posible efecto anticancerígeno de los AINEs a través de la inhibición de COX-2, por lo que se trata de una combinación que despierta bastante interés (Dore *et al.*, 2011). El primer AINE estudiado en combinación con el fosfato de toceranib fue el piroxicam. Piroxicam es un inhibidor no preferencial COX-1/COX-2, que ha demostrado actividad antitumoral frente a varios tipos de carcinomas (carcinoma de células transicionales, de células escamosas y de próstata) (Mohammed *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2001; Sorenmo *et al.*, 2004; Knapp *et al.*, 1992, 1994) y que se utiliza frecuentemente como parte de protocolos de quimioterapia metronómica en combinación con ciclofosfamida (London *et al.*, 2015; Gardner *et al.*, 2015; Elmslie *et al.*, 2008). Un estudio fase I en pacientes con tumores no MCT estableció la dosis segura de ambos fármacos en combinación igual a la dosis estándar de ambos fármacos utilizados por separado (fosfato de toceranib a 3.25 mg/kg/48 h y piroxicam a 0.3 mg/kg/24 h) (Chon *et al.*, 2012). A esta dosis no se detectaron efectos secundarios que requiriesen detener la terapia, aunque no se evaluó la toxicidad a largo plazo (Chon *et al.*, 2012; London *et al.*, 2014).

✓ **Combinación con quimioterapia tradicional**

Hasta la fecha se han realizado tres estudios fase I combinando fosfato de toceranib con quimioterápicos tradicionales que incluyen doxorubicina, vinblastina y lomustina. En el caso de la vinblastina, se probó en pacientes con MCT siendo la TLD la neutropenia con una dosis máxima tolerada (DMT) de vinblastina de 1.6 mg/m² cada 2 semanas, mientras que el fosfato de toceranib se administraba a 3.25 mg/kg/48 h. A pesar de que fue necesario casi un 50% de reducción en la dosis de vinblastina y que la valoración de la tasa de respuesta no es el objetivo en un estudio fase I, esta fue de un 71%, sugiriendo la posibilidad de que exista una actividad sinérgica al usar esta combinación (Vail 2007; Robat *et al.*, 2012). En el caso de la lomustina la DMT fue 50 mg/m² cada 3 semanas. Se obtuvo una tasa de respuesta de un 46% en pacientes con MCT, tasa similar a otras monoterapias utilizadas frente a MCT pero considerablemente superior a las tasas de respuesta de la lomustina utilizada como agente único (Burton *et al.*, 2015). En el caso de la

doxorubicina se utilizó en pacientes con diversos tipos de tumores generando respuestas en la mayoría de pacientes y la DMT se situó en 25 mg/m² de doxorubicina cada 3 semanas junto a fosfato de toceranib a 2.75 mg/kg/48 h (Pellin *et al.*, 2016).

✓ **Utilización como terapia antiangiogénica/metronómica**

La investigación del cáncer en las últimas dos décadas ha proporcionado un mejor entendimiento de las vías moleculares y los mecanismos de las metástasis y resistencias a fármacos en el cáncer. Se han diseñado tratamientos mucho más específicos/dirigidos y una de estas estrategias es lo que se conoce como quimioterapia metronómica (QM). A diferencia de la quimioterapia convencional, la QM se caracteriza por la administración continua de fármacos a dosis que son mucho más bajas que la de los tratamientos a DMT. Una de las dianas de la QM es la vascularización tumoral (en concreto la angiogénesis) y los linfocitos T reguladores (Tregs) que ayudan a las células tumorales a evadir el reconocimiento y destrucción por parte del sistema inmune en muchos tipos de cáncer en medicina humana y veterinaria (Biller 2014; O'Neill *et al.*, 2009; London *et al.*, 2014). Algunos de los fármacos más utilizados en veterinaria en tratamientos de QM son el fosfato de toceranib y la ciclofosfamida en combinación en muchos casos con AINEs sin haber sido utilizado hasta la fecha en el CIC o tumores mamarios felinos.

En el estudio publicado por Biller y Colaboradores perros con diversos tipos de cáncer recibieron fosfato de toceranib a dosis de 2.75 mg/kg/48 h durante 2 semanas demostrando un descenso en sangre periférica de los niveles y porcentajes de Tregs, con un incremento concomitante de las concentraciones en suero de interferon- γ (Biller 2014). La adición de dosis bajas de ciclofosfamida a las dos semanas, fármaco que también ha demostrado reducir niveles de Tregs y tener propiedades antiangiogénicas en perros con cáncer, no aumentó este efecto (Mitchell *et al.*, 2012; Burton *et al.*, 2011). Estos estudios indican que el fosfato de toceranib podría ser un fármaco útil en los protocolos metronómicos (Mitchell *et al.*, 2012) y han promovido nuevos estudios en osteosarcoma y hemangiosarcoma, tumores con una alta tasa de metástasis y supervivencias cortas a pesar de utilizar protocolos de quimioterapia tradicional adyuvantes a la cirugía (London *et al.*, 2015; Gardner *et al.*, 2015).

El primer estudio evaluó una terapia de mantenimiento con fosfato de toceranib después de un tratamiento con doxorubicina en pacientes con hemangiosarcoma esplénico extirpado quirúrgicamente (London *et al.*, 2015). Los

resultados indicaron que el uso de fosfato de toceranib después de la doxorubicina no mejoraba ni el TLE ni la supervivencia en perros con hemangiosarcoma estadio I o II comparado con los estudios de tratamientos adyuvantes publicados hasta la fecha (Gardner *et al.*, 2015). Un segundo estudio evaluó la combinación de fosfato de toceranib, piroxicam y ciclofosfamida como terapia de mantenimiento en pacientes con osteosarcoma. La adición de esta combinación en pacientes que habían recibido una amputación y tratamiento con carboplatino, no mejoró la mediana del TLE o supervivencia al año (London *et al.*, 2015).

El fosfato de toceranib también ha sido utilizado en pacientes caninos con linfoma. A pesar de que los protocolos de quimioterapia metronómica han demostrado actividad clínica en linfoma en humanos (Ruan *et al.*, 2011), un estudio prospectivo utilizando un protocolo metronómica consistente en fosfato de toceranib, ciclofosfamida y procarbina como terapia de rescate en linfoma multicéntrico en perros no demostró eficacia biológica. Tres perros (25%) obtuvieron EE con una mediana hasta la progresión de 28 días. A pesar de tolerarse bien no se detectaron RP o RC, siendo los efectos secundarios principalmente gastrointestinales (grado 2 n= 2, grado 3 n=1) y dos neutropenias grado 1 (Borrego *et al.*, 2014).

4.5 Utilización del fosfato de toceranib en tumores felinos

Pese a los múltiples estudios realizados en pacientes caninos, hasta el año 2016 no se han publicado los primeros estudios sobre su uso en neoplasias felinas (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016; Harper *et al.*, 2016; Merrick *et al.*, 2016). Anteriormente solo se disponía de estudios con otros ITQ como son el masitinib e imatinib (Isotani *et al.*, 2006, 2010; Lawrence *et al.*, 2012; Daly *et al.*, 2011), mientras que el fosfato de toceranib se utilizaba en gatos fuera de la indicación del prospecto y a la misma dosis que en perros.

Las dosis medias más frecuentemente utilizadas en los diferentes estudios varían entre 2.5-2.78 mg/kg administradas por vía oral (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016; Harper *et al.*, 2016; Merrick *et al.*, 2016).

En cuanto al espectro de acción del fármaco en gatos pocos de estos estudios han evaluado la eficacia biológica, siendo en su mayor parte retrospectivos y evaluando exclusivamente toxicidad. En uno de los estudios se trataron pacientes con sarcomas asociados al punto de inyección (Holtermann *et al.*, 2016), siendo este un tipo de tumor donde el PDGF juega un papel clave en su crecimiento y desarrollo,

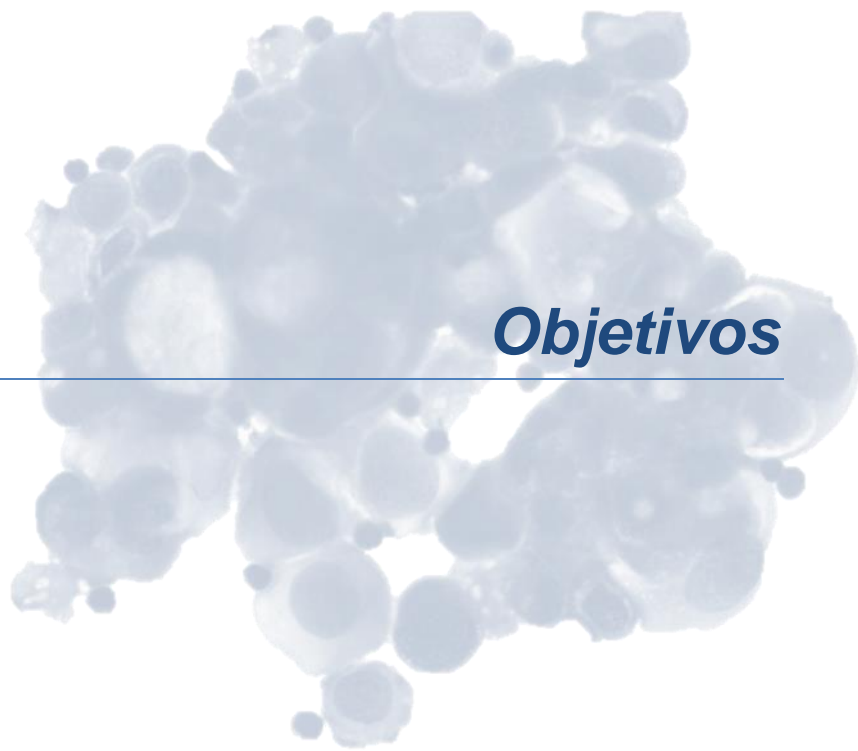
al menos *in vitro* (Lawrence *et al.*, 2012). Ninguno de los pacientes tratados en una presentación macroscópica respondieron según los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) (Nguyen *et al.*, 2015) por lo que no parece presentar eficacia biológica en este tipo de tumor (Holtermann *et al.*, 2016). Otros dos estudios evaluaron de forma retrospectiva su tolerabilidad y eficacia en gatos con carcinomas de células escamosas. En el único donde se evaluó respuesta al fármaco se pudo detectar un 56.5% de eficacia biológica total, incluyendo a los pacientes con EE. El grupo que recibió el fosfato de toceranib presentaba una supervivencia significativamente mayor (123 días) que el grupo que solo recibió tratamiento paliativo (45 días) (Wiles *et al.*, 2016). Otro de los estudios realizado con una población muy pequeña, de tan solo 14 casos, detectó un beneficio clínico del 54%, siendo los gatos con MCT los únicos que respondieron.

Los restantes estudios se centran en evaluar la tolerabilidad del fármaco de manera retrospectiva sin evaluar respuesta biológica por lo que no existe información acerca de que tumores son los más susceptibles de responder.

Estos resultados de los estudios citados demuestran que el fármaco puede ser utilizado con seguridad en pacientes felinos con efectos secundarios generalmente leves de grado 1 y 2, siendo similares en su mayoría a los descritos en perros (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016; Harper *et al.*, 2016; Merrick *et al.*, 2016). Las toxicidades grado 3 y 4 fueron infrecuentes y fácilmente manejables interrumpiendo el fármaco o realizando reducciones de dosis. La mayoría fueron de tipo gastrointestinal (anorexia, vómitos y diarrea). Algunos autores refieren una mayor incidencia de hepatotoxicidad en gatos que en perros (Merrick *et al.*, 2016).

La premisa subyacente que sustenta nuestra hipótesis de trabajo es el papel clave de la angiogénesis en ambos tipos tumorales y el posible papel inhibitor sobre los procesos que la regulan en ambos casos por parte del fosfato de toceranib. Considerando que la inhibición de receptores clave como el PDGFR, VEGFR y COX-2 (en el caso de los CIC) en el proceso de angiogénesis, tendría tanto efectos directos sobre el crecimiento de células tumorales, así como efectos indirectos en el microambiente tumoral (vascularización del tumor) resultando en respuestas objetivas en la presentación macroscópica de estos tumores. Este papel clave de la angiogénesis ha disparado los estudios clínicos en medicina humana con terapias dirigidas a la inhibición de esta vía en tumores de mama avanzados con características similares a los tumores mamarios felinos así como los carcinomas

inflamatorios en humana (CIH). Dentro de los fármacos utilizados, los ITQ como el sunitinib, fármaco muy similar al fosfato de toceranib es uno de los que más esperanzas ha despertado ya sea como monoterapia o en combinación (Robertson *et al.*, 2010). Es por eso que elegimos evaluar el fosfato de toceranib como monoterapia o en combinación, en tumores mamarios altamente agresivos tanto en perros como gatos en su presentación macroscópica.



Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es valorar la eficacia y tolerabilidad del fosfato de toceranib como monoterapia o en combinación con carprofeno, un fármaco anti-COX2, en tumores mamarios altamente agresivos como son los carcinomas mamarios felinos y los carcinomas inflamatorios caninos en su presentación macroscópica.

Los objetivos específicos propuestos para este trabajo son:

- 1. Evaluar prospectivamente la administración de fosfato de toceranib en gatas con carcinomas mamarios en su presentación macroscópica.**
 - a) Evaluar la eficacia antitumoral.
 - b) Evaluar la tolerabilidad del fármaco.

- 2. Evaluar prospectivamente la combinación de fosfato de toceranib y carprofeno administrada en perras con carcinomas inflamatorios mamarios.**
 - a) Evaluar la eficacia antitumoral.
 - b) Evaluar la calidad de vida de los pacientes.
 - c) Evaluar la tolerabilidad de la combinación.

A microscopic image of a cell culture, showing numerous cells with prominent nuclei and some larger, more rounded cells. The image is semi-transparent and serves as a background for the text.

Material y Métodos

METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DEL FOSFATO DE TOCERANIB EN TUMORES MAMARIOS FELINOS.**1.1 Diseño del estudio**

Se trata de un estudio prospectivo abierto con un solo grupo de tratamiento conducido a través de casos remitidos al Instituto Veterinario de Oncología Comparada (IVOC). Se incluyeron gatas con propietario siempre que se les hubiese diagnosticado mediante citología o histopatología un carcinoma mamario, presentándose con enfermedad macroscópica medible, primaria o metastásica. Los pacientes seleccionados para el estudio fueron tratados con fosfato de toceranib entre Enero 2013 y Junio del 2016. El estudio fue anunciado a los diferentes centros veterinarios remitores del IVOC de tal manera que los veterinarios tuviesen información sobre los criterios de inclusión y exclusión.

El diseño del estudio se realizó siguiendo la directiva 2010/63/UE recientemente aprobada por la Unión Europea en lo relativo a la experimentación con animales vivos (Dir. 2010/63/Euratom del Consejo, de 20 de Octubre de 2010). Además el diseño siguió las directrices establecidas por parte de la Conferencia Internacional de Armonización de la Buena Práctica Clínica (BPC) para proteger el bienestar y los derechos de los participantes en los ensayos clínicos (Dixon *et al.*, 1998) Estas directrices de BPC definen las normas sobre el diseño y realización de los estudios en medicina humana, recolección y análisis de datos, así como la auditoría y la información de los ensayos clínicos con el objetivo de proporcionar la seguridad de que los resultados del estudio sean creíbles. Estos conceptos ya se aplican en la mayoría de ensayos clínicos veterinarios aunque no se encuentren estandarizados (Page *et al.*, 2016).

1.2 Selección de pacientes

El diagnóstico se realizó en primer lugar cuando se identificaba una masa en el tejido mamario seguido de una toma de muestras citológica o histopatológica. En aquellos casos en los que se realizó un diagnóstico histopatológico el tipo de biopsia incisional fue siempre con un punch de 3-4 mm de diámetro tomando al menos dos muestras. En todos los casos se sedó o anestesió al paciente, variando los protocolos dependiendo del veterinario que realizaba la técnica. En todos los casos

el defecto originado se suturaba con puntos simples y sutura monofilamento reabsorbible de grosor 2/0 o 3/0 recomendando a los dueños la colocación de un collar isabelino para que no se autolesionasen la zona. Los fragmentos obtenidos fueron fijados en formol al 10% y enviados al laboratorio para su análisis histopatológico. Las muestras de tejido se procesaron rutinariamente, generando un bloque de parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 3 a 5 micras de grosor para su tinción con hematoxilina y eosina. Los tumores se clasificaron inicialmente de acuerdo con los subtipos descritos por la OMS para los carcinomas mamarios felinos (Misdorp *et al.*, 1999). El grado del tumor se evaluó siguiendo el sistema de clasificación histológica de Elston y Ellis comúnmente utilizado por los investigadores veterinarios para la clasificación de tumores felinos (Castagnaro *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 2015). Este sistema representa el estándar a la hora de evaluar el cáncer de mama humano invasivo, evaluando porcentaje de formación de túbulos, pleomorfismo nuclear, y el recuento mitótico. Sobre la base de la puntuación total derivado de este sistema, el grado del tumor se clasificó en grado 1 correspondiente a un tumor bien diferenciado; grado 2 o moderadamente diferenciado, y grado 3 pobremente diferenciado (Castagnaro *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 2015). El resumen de los criterios utilizados en dicha clasificación se muestran en la **Tabla 1**. En caso de que el laboratorio no describiese el grado se pedía una revisión y que se evaluara y describiera siguiendo esos criterios.

En aquellos casos en que se obtuvo una muestra citológica para llegar al diagnóstico se realizaban al menos 2-3 PAF en varias zonas de cada lesión en el caso del tumor primario y en el caso de las muestras de los ganglios se realizaban tantas PAF como fuesen necesarias hasta obtener una muestra con suficiente celularidad para poder ser evaluada. En todas las muestras se evaluó la celularidad así como la distribución de la población neoplásica. En los tumores primarios se determinaron como adenocarcinoma si al menos el 20% de las células epiteliales tenía más de 3 criterios nucleares de malignidad descritos en la bibliografía como anisocariosis, macrocariosis, moldeamiento nuclear o presencia de macronucleolos (Simon *et al.* 2009; Alleman *et al.*, 2000; Meinkoth *et al.*, 2002). En el caso de las metástasis ganglionares la presencia de uno o varios “clusters” con criterios de malignidad citoplasmáticos o nucleares dentro de la población celular ganglionar normal se consideró suficiente para llegar al diagnóstico.

La evaluación inicial requirió de la realización de un examen físico incluyendo una medición del diámetro de la lesión primaria con un pie de rey, una ecografía abdominal, radiografías torácicas (tres vistas latero-lateral derecha, latero-lateral

izquierda y ventrodorsal/dorsoventral), hemograma, bioquímica (que incluyese al menos los valores de alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), creatinina, urea, glucosa y proteínas totales (PT)) así como urianálisis (que incluyese al menos pH, densidad, glucosa, cuerpos cetónicos, nitritos, leucocitos, bilirrubina, proteínas). Las pruebas en este protocolo de evaluación inicial se realizaron durante los 7 días previos al inicio del tratamiento y al menos el examen físico y medición de la lesiones fueron realizados por el veterinario encargado del caso aceptando que el resto de pruebas se hubiesen realizado en otros centros mientras que se dispusiese de los resultados para su interpretación antes del comienzo del estudio.

Tabla 1. Sistema de graduación Elston y Ellis en los carcinomas mamarios felinos invasivos.

Característica Histopatológicas		Valor
Formación de túbulos		
• Presente en la mayor parte del tumor (>75%)		1
• Presente de forma moderada (10%–75%)		2
• Poco o nada presente (<10%)		3
Pleomorfismo nuclear		
• Núcleo pequeño, regular y uniforme		1
• Aumento moderado de tamaño, presencia de vesículas		2
• Cromatina vesicular con variaciones muy marcadas en tamaño y forma		3
Recuento mitótico ^(a)		
• 0–8		1
• 9–16		2
• >17		3
Puntos totales	Grado	Comentario
3-5	I	Bien diferenciado
6-7	II	Moderadamente diferenciado
8-9	III	Escasamente diferenciado
^a Número acumulativo de mitosis en 10 campos consecutivos en el área con más actividad mitótica con un diámetro de campo en el microscopio de 0.53 mm (Objetivo 40x). (Modificado de Mills <i>et al.</i> , 2015)		

La descripción de las mamas afectadas por los tumores se realizó utilizando la letra I para la cadena izquierda, letra D para la cadena derecha seguido del número de mama afectada, siendo la número 1 la más craneal a nivel axilar y la 4 la mama más caudal inguinal. En aquellos casos que los ganglios locoregionales (inguinal o axilar) se encontrasen aumentados de tamaño, se realizó una PAF usando una aguja de calibre 23G. Las muestras se extendieron en un portaobjetos y se tiñeron con la tinción Diff Quick (Merck, Darmstadt, Alemania). Se realizó un diagnóstico de metástasis cuando se detectaba la presencia de células epiteliales

formando “clusters” entre las células habituales de un ganglio. Del mismo modo si se detectaban alteraciones ecográficas en los ganglios intraabdominales o en otros órganos susceptibles de poder puncionarse, se realizó una PAF y citología del mismo modo que en los ganglios periféricos con la diferencia de la ayuda ecoguiada.

Tras la primera consulta y una vez analizado los resultados de las pruebas solicitadas anteriormente, las gatas eran elegibles para el tratamiento si además cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- Preexistencia de síntomas gastrointestinales < grado 2 según Criterios de Terminología Común Veterinaria del Grupo de Oncología Cooperativa (VCOG-CTCAE) (**Tabla 2**)
- Parámetros hematológicos y bioquímicos adecuados para comenzar la terapia de manera segura (VCOG-CTCAE < grado 2) (**Tabla 2**).
- Se admitieron gatas que hubiesen recibido tratamientos quimioterápicos previos (excluyendo el fosfato de toceranib), corticosteroides o AINEs, siempre y cuando hubiese un periodo de al menos 2 semanas desde que interrumpieron los tratamientos hasta la entrada en el estudio.
- En todos aquellos casos que hubiesen recibido tratamientos quimioterápicos previos, los tumores tenían que haber progresado o recidivado antes de comenzar el estudio.
- Después del examen físico y la valoración clínica del veterinario la esperanza de vida estimada del paciente sin tratamiento debería ser superior a los dos meses.

Antes de la inclusión de los pacientes, los dueños recibieron y firmaron un consentimiento informado (**Anexo 1**) explicando los objetivos del estudio. El consentimiento informado para el dueño se generó siguiendo criterios ya descritos previamente (Page *et al.*, 2016; Vail 2007; Burton *et al.*, 2014).

Una vez comunicado y explicado claramente a los propietarios el documento de consentimiento, se les dio el tiempo suficiente para valorar la participación de su mascota (Page *et al.*, 2016; Vail 2007; Burton *et al.*, 2014). Dicho documento contenía el objetivo de estudio, los riesgos y beneficios asociados, el diseño del estudio y las intervenciones requeridas, fuente de financiación, los incentivos para el propietario, así como cualquier posible conflicto de interés del personal participando en el estudio.

Tabla 2. Clasificación de los efectos adversos diagnosticados en los pacientes durante el tratamiento con fosfato de toceranib. (modificado de Veterinary Comparative Oncology Group)

Efectos secundarios	Grado				
	1	2	3	4	5
Neutropenia	1500 K/μl a VLIN	1000-1499 K/μl	500-999 K/μl	<500 K/μl	Muerte
FA	VLSN-1.25 x VLSN	1.25-1.5 x VLSN	1.5-2 x VLSN	>2 x VLSN	-
ALT	VLSN-1.25 x VLSN	1.25-1.5 x VLSN	1.5-2 x VLSN	>2 x VLSN	-
Urea	VLSN-1.5 x VLSN	1.5-2 x VLSN	2-3 x VLSN	>3 x VLSN	-
Creatinina	VLSN-1.5 x VLSN	1.5-2 x VLSN	2-3 x VLSN	>3 x VLSN	-
Vómitos	<3 episodios en 24h intervención médica no indicada	3-10 episodios en 24 h; <5 episodios al día durante 48h; Necesidad de fluidos parenterales (IV o SC) <48 h; medicación indicada	Múltiples episodios >48 h y fluidos IV o necesidad de nutrición parenteral >48 h	Riesgo de muerte	Muerte
Diarrea	Incremento de dos deposiciones al día desde el inicio del tratamiento; no aumenta la frecuencia pero disminuye la consistencia	Incremento de 3-6 deposiciones al día; medicación indicada; fluidos parenterales (IV o SC) indicadas <48 h; no interfiere con ADN	Incremento de >6 deposiciones al día; incontinencia >48 h; fluidos IV >48 h; hospitalización; interfiere con ADN	Riesgo de muerte	Muerte
Hipopigmentación	Leve y localizada	Marcada o generalizada	-	-	-
Anorexia	Necesidad de modificar tipo dieta para que coma	Toma de alimentos alterada (<3 día) sin pérdida de peso significativa; suplementos nutricionales orales/estimulantes del apetito pueden estar indicados	>3 días; asociada con pérdida significativa de peso (>10%) o malnutrición; fluidos IV, tubo de alimentación o alimentación forzada indicada	Riesgo para la vida del animal; Nutrición parenteral necesaria >5 días de duración	Muerte

FA = Fosfatasa alcalina; ALT = alanina transaminasa; VLIN = Valor límite inferior normal; VLSN = Valor límite superior normal IV = intravenoso; SC = subcutáneo; LSN (límite superior normal) ADN = Actividades diarias normales

Una vez incluidos los pacientes en el estudio, y al comienzo de éste, se entregó a los propietarios un documento con el protocolo de visitas establecido durante todo el ensayo clínico (**Anexo 2**). Todos aquellos pacientes que no cumplieren el protocolo de visitas establecido fueron eliminados del estudio.

Una vez concluido el estudio previo, con el consentimiento informado de los propietarios y establecido el protocolo de visitas, todas las gatas recibieron fosfato de toceranib (Palladia®, Pfizer Animal Health Inc., New Jersey, USA) a una dosis entre 2.3 y 3.25 mg/kg administrada por vía oral cada 48 h. Se advirtió a los dueños de que era necesaria la utilización de guantes para la administración del fármaco. En el caso de que no se pudiese conseguir administrar la dosis dentro del rango pautado con las formulaciones de fosfato de toceranib disponibles (10 mg, 15 mg y 50 mg) se procedió a reformularlo a la dosis estipulada para cada paciente.

1.3 Recogida de datos

Los datos obtenidos para cada gata incluyeron su reseña, peso (en Kg), estado reproductivo (incluyendo fechas de realización de esterilización y tratamientos hormonales previos si los hubiese habido), la localización y el tamaño del tumor en centímetros, tratamientos y cirugías previas, resultados de histopatología y citología, la tasa de respuesta según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015), toxicidades según criterios VCOG-CTCAE (VCOG 2011), reducciones de la dosis, retrasos en el tratamiento, tipos de tratamientos de rescate así como la causa de la muerte. En este último caso, se solicitó permiso para realizar una necropsia en el momento de la muerte de la gata y se registró la información de la necropsia. Al finalizar el estudio se procedió a contactar a los dueños y veterinario remitir vía telefónica para determinar día y causa de la muerte.

1.4 Evaluación de la respuesta tumoral

A las 2 semanas de iniciar el tratamiento se realizó una exploración física y un hemograma al paciente. Al mes de iniciar el tratamiento se evaluó la respuesta al mismo y su toxicidad repitiendo el protocolo inicial de evaluación descrito anteriormente.

La respuesta al tratamiento se evaluó siguiendo los criterios del sistema RECIST (Nguyen *et al.*, 2015) (**Tabla 3**). El tratamiento se continuó mientras hubiese una respuesta o la enfermedad no progresara.

Tabla 3. Resumen de los criterios RECIST para evaluar respuesta en tumores sólidos (modificado de Nguyen *et al.*, 2015) y que han sido utilizados en este estudio.

Caracterización de la respuesta	Definición
Respuesta Completa (RC)	Desaparición de todas las lesiones diana
Respuesta Parcial (RP)	Al menos un 30% de reducción en la suma de todas las lesiones diana
Enfermedad Progresiva (EP)	Al menos un incremento del 20% en la suma de los diámetros de las lesiones diana usando la suma más pequeña tomada durante el estudio como referencia o la aparición de nuevas lesiones
Enfermedad Estable (EE)	<30% de reducción (RP) o 20% de incremento (EP) de tamaño usando la suma más pequeña obtenida durante el estudio como referencia

Las lesiones diana se midieron usando un pie de rey, valoración ecográfica, radiográfica o mediante tomografía axial computarizada (TAC) dependiendo de la localización y accesibilidad. Los criterios para evaluar la respuesta al fosfato de toceranib se detallan en la **Tabla 3**. Se definió RC como la regresión completa de la enfermedad; la RP se definió como al menos una disminución del 30% en el diámetro más largo del tumor. Enfermedad progresiva se definió como aumento de más del 20% en el diámetro más largo del tumor o la aparición de nuevas lesiones.

En el caso que el paciente presentara EP en alguna de las evaluaciones de respuesta se procedió a la suspensión del tratamiento facilitándole al dueño la posibilidad de comenzar con otras alternativas terapéuticas. En caso contrario, se continuó con el mismo protocolo de evaluación descrito anteriormente y con una frecuencia mensual.

Se definió beneficio clínico para aquellos pacientes que mantuviesen RC, RP o EE al menos durante 2 meses.

1.5 Evaluación de la toxicidad

Para detectar posibles casos de toxicidad asociados al tratamiento con fosfato de toceranib, se pidió a los propietarios un seguimiento estricto de cualquier cambio en las actitudes de sus mascotas, así como que informasen de cualquier

evento como vómitos, diarrea, u otros signos clínicos que se pudiesen atribuirse a la administración del fármaco. Cada evento adverso se clasificó según el VCOG-CTCAE (VCOG 2011) para determinar la gravedad del mismo (**Tabla 2**). El VCOG-CTCAE utiliza detalles acerca de la severidad, la duración y la terapia necesaria para gestionar los signos relacionados con el evento con el fin de definir el grado (gravedad) de un evento adverso. En general los eventos adversos grado 1 son leves y autolimitantes, los grado 2 son moderados y frecuentemente se manejan administrando de forma ambulatoria medicamentos por vía oral, los grado 3 son graves y con frecuencia requieren de tratamiento hospitalario, los eventos grado 4 son potencialmente mortales, y los de grado 5 resultan en la muerte del paciente (**Tabla 2**). Se consideraron toxicidades limitantes de dosis (TLD) aquellas de grado 3 o 4 (hematológicas, renales, gastrointestinales), que fuesen refractarias al tratamiento de soporte recomendado o que durasen más de 7 días. En pacientes con TLD se interrumpió el tratamiento. El resto de animales con toxicidades grado 1 o 2 se manejaron con las terapias de soporte habituales.

Se admitieron reducciones en la dosis de fosfato de toceranib (siempre que se mantuviesen por encima de 2.3 mg/kg), disminución de frecuencia (administración dos días por semana, o administración cada 3 días) así como suspensiones temporales (habitualmente 5-7 días) en el tratamiento, en el caso en que aparecieran síntomas de toxicidad y éstos lo requirieran.

METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ESTUDIO DEL FOSFATO DE FOSFATO DE TOCERANIB Y CARPROFENO EN CARCINOMAS INFLAMATORIOS CANINOS.

2.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio prospectivo con un solo grupo de tratamiento no ciego y abierto, conducido a través de pacientes remitidos al Instituto Veterinario de Oncología Comparada (IVOC). Se incluyeron perras siempre que se les hubiese diagnosticado con un carcinoma inflamatorio (CI) Las pacientes seleccionadas para el estudio fueron tratadas con fosfato de toceranib y carprofeno entre enero del 2013 y Junio del 2016. El estudio fue anunciado a los diferentes centros remitores del IVOC de tal manera que los veterinarios tuviesen una idea de los criterios de inclusión y exclusión.

El diseño del estudio se realizó siguiendo la directiva 2010/63/UE recientemente aprobada por la Unión Europea en lo relativo a la experimentación con animales vivos (Dir. 2010/63/Euratom del Consejo, de 20 de Octubre de 2010). Además el diseño también siguió las directrices establecidas por parte de la Conferencia Internacional de Armonización de la Buena Práctica Clínica (BPC) para proteger el bienestar y los derechos de los participantes en los ensayos clínicos (Dixon *et al.*, 1998) Estas directrices de BPC definen las normas sobre el diseño y realización de los estudios en medicina humana, recolección y análisis de datos, así como la auditoría y la información de los ensayos clínicos con el objetivo de proporcionar la seguridad de que los resultados del estudio sean creíbles. Estos conceptos ya se aplican en la mayoría de ensayos clínicos veterinarios aunque no se encuentren estandarizados (Page *et al.*, 2016).

2.2 Selección de pacientes

Se procedió al diagnóstico clínico presuntivo de CI al identificar una masa mamaria asociada a eritema, calor, y edema de la glándula mamaria. Además del diagnóstico presuntivo inicial se realizó un diagnóstico histopatológico durante la visita inicial, o previamente en el centro remitidor del paciente. El tipo de biopsia incisional necesaria para llegar al diagnóstico dependió de la preferencia del veterinario que realizaba la técnica. En todos los casos se sedó o anestesió al paciente, variando los protocolos dependiendo del veterinario que realizaba la

técnica. Los dos tipos de biopsias incisionales que se realizaron fueron “en cuña” obteniendo como mínimo dos fragmentos de tejido con bisturí, o con un “punch” comercial de 4-6 mm de diámetro tomando al menos dos muestras. En ambos casos se obtuvo tejido incluyendo piel y el defecto originado se suturó con puntos simples y sutura monofilamento no reabsorbible de grosor 2/0 o 3/0 recomendando a los dueños la colocación de un collar isabelino para que la perra no se autolesionase la zona. Los fragmentos obtenidos fueron fijados en formol al 10% y enviados al laboratorio para su análisis histopatológico. Las muestras de tejido se procesaron rutinariamente, generando un bloque de parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 3 a 5 micras de grosor para su tinción con hematoxilina y eosina. Siendo necesario detectar émbolos neoplásicos en los vasos linfáticos dérmicos para confirmar la enfermedad (Clemente *et al.*, 2010).

Las perras con lesiones que se hubiesen desarrollado en las glándulas mamarias normales fueron clasificados con CIC primario, mientras que las perras que desarrollaban la enfermedad habiendo tenido previamente tumores mamarios con un diagnóstico diferente al de CIC fueron clasificados como CIC secundario.

La evaluación inicial requirió de la realización de un examen físico incluyendo una medición del diámetro de la lesión primaria con un pie de rey, una ecografía abdominal, radiografías torácicas (tres vistas latero-lateral derecha, latero lateral izquierda y ventrodorsal/dorsoventral), hemograma, bioquímica (que incluyese al menos los valores de ALT, FA, creatinina, urea, glucosa y PT) y urianálisis (que incluyese al menos pH, densidad, glucosas, cuerpos cetónicos, nitritos, leucocitos, bilirrubina, proteínas totales). Las pruebas en este protocolo de evaluación inicial se realizaron durante los 7 días previo al inicio del tratamiento y al menos el examen físico y medición de la lesiones se realizaron por el veterinario responsable aceptando que el resto de pruebas se hubiesen realizado en otros centros mientras que se dispusiese de los resultados para su interpretación antes del comienzo del estudio.

La descripción de las mamas afectadas por los tumores se realizó utilizando la letra I para la cadena izquierda, letra D para la cadena derecha seguido del número de mama afectada siendo el 1 la más craneal a nivel axilar y el 5 la mama más caudal inguinal.

En aquellos casos en los que los ganglios locoregionales (inguinal o axilar) se encontraban aumentados de tamaño se realizó una punción de aguja fina (PAF) usando una aguja de 23G. Las muestras se extendieron en un portaobjetos y se

tiñeron con tinción Diff Quick (Merck, Darmstadt, Alemania). En las muestras se evaluó la celularidad así como la distribución de la población neoplásica. La presencia de uno o varios “clústers” con criterios de malignidad citoplasmáticos o nucleares dentro de la población celular ganglionar normal se consideró suficiente para llegar al diagnóstico de metástasis. Del mismo modo si se detectaban alteraciones ecográficas en los ganglios intraabdominales o en otros órganos susceptibles de poder puncionarse, se procedió a la realización de una PAF y citología del mismo modo que en los ganglios periféricos con la diferencia de la ayuda ecoguiada.

Tras la primera consulta y una vez analizado los resultados de las pruebas solicitadas anteriormente, los perros eran elegibles para el tratamiento si además cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- a. Presencia de lesiones macroscópicas medibles según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015).
- b. Parámetros hematológicos y bioquímicos adecuados para comenzar la terapia de manera segura (VCOG-CTCAE < grado 2) (**Tabla 2**).
- c. Se admitieron pacientes que hubiesen recibido tratamientos quimioterápicos previos (excluyendo el fosfato de toceranib) y prednisona, siempre y cuando existiese un periodo de al menos 2 semanas desde que interrumpieron los tratamientos hasta la entrada en el estudio. Se permitió el uso previo de AINEs siempre y cuando se hubiese cesado su administración una semana antes de entrar en el estudio.
- d. En todos aquellos casos que hubiesen recibido tratamientos quimioterápicos previos, los tumores tenían que haber progresado o recidivado antes de comenzar el estudio.
- e. Se aceptó el uso de otros fármacos analgésicos como tramadol siempre y cuando el paciente ya los llevase tomando al menos 5 días antes de comenzar el estudio.
- f. Los perros con metástasis locoregionales y metástasis a distancia a otros órganos como bazo, hígado y pulmones también se podían incluir en el estudio.

Antes de la inclusión de los pacientes, los dueños recibieron y firmaron un consentimiento informado (**Anexo 3**) explicando los objetivos del estudio, los riesgos y beneficios asociados, el diseño y las intervenciones requeridas, fuente de

financiación, los incentivos para el propietario, así como cualquier posible conflicto de interés del personal que participó en el estudio. Dicho consentimiento informado para el dueño se generó siguiendo criterios ya descritos previamente (Page *et al.*, 2016; Vail 2007; Burton *et al.*, 2014).

Una vez incluidos los pacientes en el estudio, y al comienzo de éste, se entregó a los propietarios un documento con el protocolo de visitas establecido durante todo el ensayo clínico (**Anexos 4 y 5**). Todos aquellos pacientes que no cumplieren el protocolo de visitas establecido fueron eliminados del estudio.

Una vez concluido el estudio previo, y con el consentimiento informado de los propietarios así como establecido el protocolo de visitas, la dosis pautada a todas las perras fue:

- Carprofeno (Rimadyl® Pfizer Animal Health Inc., New Jersey, USA) a una dosis de 4.4 mg/kg vía oral una vez al día con comida. Los comprimidos se podían partir para obtener la dosis más cercana a 4.4 mg/kg/día.
- Fosfato de toceranib (Palladia® Pfizer Animal Health Inc., New Jersey, USA) a una dosis entre 2.4 y 3.25 mg/kg administrada por vía oral 3 veces a la semana (Lunes, Miércoles y Viernes) siempre con guantes y sin poder partir los comprimidos. Siempre que la formulación existente del fármaco (comprimidos de 10, 15 y 50 mg) lo permitiese la dosis se intentaba optimizar al rango de 2.4-2.7 mg/kg basándose en los datos preliminares de los que disponíamos del grupo de Bernabe y colaboradores (Bernabe *et al.*, 2013).

2.3 Recogida de datos

Los datos recogidos para cada perra incluyeron reseña, peso (en Kg), estado reproductivo (incluyendo fechas de esterilización y tratamientos hormonales previos si los hubiese habido), la localización y el tamaño del tumor, tratamientos y cirugías previas, tipo de presentación (CIC primario o secundario), resultados de histopatología, método de adquisición de la biopsia y complicaciones asociadas, la tasa de respuesta RECIST (Nguyen *et al.*, 2015), respuesta de las lesiones no diana que no se incluyesen en el sistema RECIST (linfedema, rojez, firmeza y dolor de la lesión) (Nguyen *et al.*, 2015), la mejoría clínica (en base a los cuestionarios de calidad de vida rellenos por el propietario (**Anexo 6**), toxicidades según criterios VCOG-CTCAE (**Tabla 2**) así como reducciones de la dosis, retrasos del tratamiento, tratamientos de rescate y causa de muerte. En todos los casos se solicitó permiso

para realizar una necropsia en el momento de la muerte de la perra y se registró la información de la necropsia. Al finalizar el estudio se procedió a contactar a los dueños y veterinario remitidor vía telefónica para determinar día y causa de la muerte.

2.4 Evaluación de la respuesta tumoral

Para el estudio de la respuesta tumoral, a los 14 días de comenzar el tratamiento se realizó un hemograma y examen físico a los pacientes, junto con la cumplimentación del formulario de calidad de vida (**Anexo 6**). Al mes de comenzar el tratamiento se repitió el protocolo de evaluación inicial y posteriormente de manera mensual. El tratamiento se continuó mientras hubiese una respuesta o enfermedad estable.

La respuesta se determinó a través las mediciones objetivas usando el diámetro más largo del tumor medido con un pie de rey de manera mensual según criterios RECIST (**Tabla 3**). Se definió RC como la respuesta completa de la enfermedad; la RP se definió como al menos una disminución del 30% en el diámetro más largo del tumor; EE se definió como ni RC ni RP mantenido al menos 4 semanas. Enfermedad progresiva se definió como aumento de más del 20% en el diámetro más largo del tumor o la aparición de nuevas lesiones (Nguyen *et al.*, 2015).

Se definió beneficio clínico para aquellos pacientes que mantuviesen RC, RP o EE al menos 1 mes y además los dueños considerasen que su calidad de vida era mejor que al principio del tratamiento según la valoración de la Escala de Evaluación Visual (EEV) del **Anexo 6**. En todos los casos en que se observó progresión de la enfermedad se les ofreció terapia de rescate, tal y como se describe en el apartado de tumores mamarios felinos.

2.5 Evaluación de la toxicidad

Junto al protocolo de visitas (**Anexos 4 y 5**), se entregó a los propietarios un formulario de calidad de vida modificado ligeramente del descrito previamente por Lynch y colaboradores. (Lynch *et al.*, 2011) (**Anexo 6**), así como un diario donde los dueños pudiesen detallar los posibles efectos secundarios (**Anexo 7**).

El cuestionario de calidad de vida era autorellenable por parte del dueño. En caso de dudas, el dueño podía consultar a un auxiliar o veterinario en caso de que

necesitase ayuda para rellenarlo. El diseño inicial se fijo en las 8 cualidades que mejor evaluaban la calidad de vida de los pacientes recibiendo tratamiento oncológico en veterinaria. Estas cualidades incluían felicidad, estado mental, dolor, apetito, higiene, ingesta de agua (hidratación), movilidad y salud general. Las preguntas se redactaron con terminología fácilmente entendible por los dueños. El cuestionario se dividió en 8 dominios con 3 preguntas evaluando cada uno de las cualidades mencionadas con anterioridad valorándose mediante preguntas con respuestas en una escala de 1 a 5. El 1 representaba en desacuerdo y el 5 muy de acuerdo. En el caso de evaluación de la salud general se dividió de nuevo en dos preguntas comparándola con la visita anterior y con el comienzo del estudio valorándose también del 1 del 5 siendo 1 peor, 3 igual y 5 mejor. La pregunta final fue una EEV valorando la calidad de vida (Finch *et al.*, 2011). Esta escala consistió en una línea continua donde el inicio de la línea correspondía a una calidad de vida muy pobre y el punto del final una calidad de vida excelente. Conociendo el tamaño de la línea en cm se asignaba un valor numérico del 1 al 10 según la marca del dueño.

Los propietarios completaron un cuestionario en cada visita que describía signos clínicos del perro en su casa desde la visita anterior. Además recogieron todos estos efectos secundarios gracias a un diario de efectos secundarios (**Anexo 7**) que se le proporcionaba en cada consulta. Los eventos adversos se clasificaron utilizando los criterios VCOG-CTACE para los eventos adversos (**Tabla 2**).

3 ESTADÍSTICA

Las variables continuas se expresaron como medias \pm desviación estándar y los variables categóricas como frecuencias y porcentajes. Para expresar los resultados de ambos estudios prospectivos abiertos y con un solo brazo se utilizaron estadísticas descriptivas sin un modelo estadístico formal. La metodología de Kaplan-Meier se utilizó para evaluar la supervivencia mediana libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (Rich *et al.*, 2010). La SLP se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta progresión de la enfermedad siguiendo criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015). El tiempo de supervivencia global se calculó como el

tiempo desde que se incluían en el estudio hasta la muerte por cualquier causa. Los animales fueron excluidos de ambos análisis si no se determinó con exactitud el tiempo transcurrido hasta la progresión.

En el caso de la evaluación de la calidad de vida según la EEV y las contestaciones en las diferentes categorías del cuestionario de calidad de vida en el estudio de los perras con CIC se utilizó un análisis t-test pareado sin asumir una distribución gaussiana utilizando el test de Wilcoxon para comprobar diferencias en los valores pareados. Se compararon las medias del grupo de perras al diagnóstico frente a los 15 días y 30 días. En todos los casos se consideró $P < 0,05$ como una diferencia estadísticamente significativa.

Para el análisis estadístico se utilizó el software comercial Graphpad Prism 7.0 (San Diego, CA).



Resultados

1

ESTUDIO DEL FOSFATO DE TOCERANIB EN TUMORES MAMARIOS FELINOS.

A continuación se presentan los resultados correspondientes al estudio prospectivo con fosfato de toceranib como monoterapia en gatas con tumores mamarios evaluando la eficacia antitumoral y la tolerabilidad del fármaco.

1.1 Población de estudio

Diecisiete gatas cumplieron los criterios de inclusión descritos en Material y Métodos y se incluyeron en el estudio. Seis gatas evaluadas para la inclusión del estudio fueron excluidas debido a que no cumplieron los criterios de inclusión establecidos, el protocolo del estudio o pruebas requeridas. En cuatro casos solo se realizaron las pruebas previas y decidieron no comenzar con el fármaco a pesar de que cumplían los criterios de inclusión del estudio. Los motivos que facilitaron esos dueños fueron principalmente que se lo habían pensado mejor durante el tiempo que habían esperado a los resultados de histopatología y que no querían administrar ningún fármaco a sus animales que pudiese afectar su calidad de vida. Uno de los casos presentaba una insuficiencia renal grave estadio IV según la clasificación de la Sociedad Internacional con Interés Renal (IRIS) (IRIS 2016) excluyéndola del estudio. En el otro caso tuvimos que excluirla del estudio al contactar con su veterinario y detectar que no cumplían el requisito de un periodo de al menos 2 semanas desde que interrumpieron los tratamientos quimioterápicos previos antes de la entrada en el estudio.

Las gatas en este estudio fueron evaluadas desde Enero de 2013 hasta junio de 2016. La mediana de edad fue de 10.64 años (rango 8-16 años). Habían doce gatas intactas y cinco esterilizadas. De las cinco gatas que habían sido esterilizadas en cuatro de ellas la esterilización se había realizado después de los 2 años de edad y en otro caso el dueño desconocía la fecha. Trece gatas eran de la raza común europea, tres siamesas, y uno de raza persa. El peso corporal promedio fue de 3,8 kg (rango de 2.1-6.2 kg). Ninguno de los dueños recordaba que las gatas hubiesen recibido tratamientos hormonales de ningún tipo. La **Tabla 4** resume las principales características de las gatas al inicio del estudio.

Tabla 4. Reseña de las gatas que participaron en el estudio.

Caso	Edad (años)	Peso (Kg)	Raza	Esterilizada	Años desde Esterilización
1	8	3.5	Común europea	No	
2	12	4.3	Persa	No	
3	11	3.3	Común europea	No	
4	10	2.6	Común europea	Si	3
5	16	2.1	Común europea	No	
6	9	3.1	Siamesa	Si	2
7	10	4.2	Común europea	No	
8	12	5.5	Común europea	No	
9	8	4.7	Común europea	Si	Dueño desconocía fecha exacta
10	14	3.5	Común europea	No	
11	8	3.8	Siamesa	No	
12	14	3.9	Común europea	No	
13	8	3.3	Común europea	No	
14	12	2.6	Común europea	Si	4
15	11	3.2	Siamesa	No	
16	9	6.2	Común europea	No	
17	10	5.2	Común europea	Si	3

Cuatro gatas presentaron una recidiva de una cirugía previa y trece gatas presentaron tumores “de novo”. Cuatro de las gatas con tumores “de novo” presentaron el tumor en la cadena contralateral después de una cirugía previa en la otra cadena y 2 en la misma cadena después de haberse realizado mastectomías regionales incluyendo solo 1 o 2 mamas. Todas las cirugías fueron realizadas en los centros veterinarios remitentes de los casos. Dos gatas presentaron 2 tumores en el diagnóstico considerándose el de mayor tamaño en las mediciones RECIST (Nguyen *et al.*, 2015) para evaluar respuesta. En nueve gatas la localización fue en mamas caudales, mientras que seis gatas presentaron tumores en las mamas craneales y dos gatas en mamas craneales y caudales.

En el momento del diagnóstico, el tamaño medio de los tumores de todas las gatas teniendo en cuenta el diámetro más largo fue de 2.95 cm (rango 1.3-5.1 cm). Cuatro gatas presentaron tumores ulcerados siendo tres de ellos recidivas (**Figura 3**). De las cuatro gatas donde el tumor estaba ulcerado, dos fueron incluidas en el estudio mientras estaban recibiendo antibiótico y en ambos casos ya llevaban 5 y 7 días con el tratamiento de cefovecina (Convenia®, Zoetis). Las otras dos pacientes solo estaban recibiendo limpieza y desinfección diaria tópica de las lesiones por parte de sus dueños.



Figura 3. Imágenes de la apariencia macroscópica de algunos de los tumores mamarios ulcerados que se presentaron en el estudio. Todos los tumores fueron medidos en su diámetro más largo en cm siguiendo criterios RECIST.

La **Tabla 5** resume las características principales referentes al tumor en el examen físico de las gatas al inicio del estudio.

Tabla 5. Características de los tumores en el examen físico.

Caso	Localización	Cirugía previa-localización	Presentación	Tamaño (cm)	Ulceración
1	D4	No	“de novo”	2.3	
2	I3	No	“de novo”	3.7	Si
3	D2	Si (Mastectomía simple D2)	recidiva	4	
4	I4	Si (Mastectomía regional D3/D4)	“de novo”	1.8	
5	D1	Si (Mastectomía regional D1/D2)	recidiva	5.1	Si
6	D3	Si (Mastectomía unilateral completa derecha)	recidiva	3.2	Si
7	D4	No	“de novo”	4.1	
8	I4/I2	Si (Mastectomía unilateral completa cadena derecha)	“de novo”	3.3	
9	I1	Si (Nodulectomía I1)	recidiva	2.1	Si
10	D3	No	“de novo”	2.6	
11	I3/I1	Si (Mastectomía unilateral completa derecha)	“de novo”	1.5	
12	D4	No	“de novo”	1.7	
13	D4	No	“de novo”	2.1	
14	I4	Si (Mastectomía regional I1/I2)	“de novo”	2.8	
15	D1	Si (Mastectomía unilateral completa cadena izquierda)	“de novo”	4.3	
16	I2	No	“de novo”	2.7	
17	D1	Si (mastectomía regional D3,D4)	“de novo”	2.9	

El método de diagnóstico más empleado fue una biopsia incisional tipo punch con sedación y anestesia local en nueve casos siendo una biopsia en cuña en otros dos casos, tal y como se describe en materiales y métodos. En todos los casos se aproximaron los bordes con sutura reabsorbible y ninguna de las gatas presentó complicaciones posteriores a la biopsia en la zona de la herida. En aquellos casos que se disponía del análisis histopatológico seis gatas presentaron un adenocarcinoma grado III mientras que cinco gatas presentaron un adenocarcinoma grado II. En uno de los casos diagnosticados mediante citología se realizó un estudio *postmortem* confirmando que se trataba de un adenocarcinoma grado III. No todos los informes de histopatología definieron el subtipo de carcinoma pero en todos los casos se definió el grado. En cuatro casos se describieron como tubulopapilares (**Figura 4**) y en otros cuatro casos como adenocarcinomas sólidos.

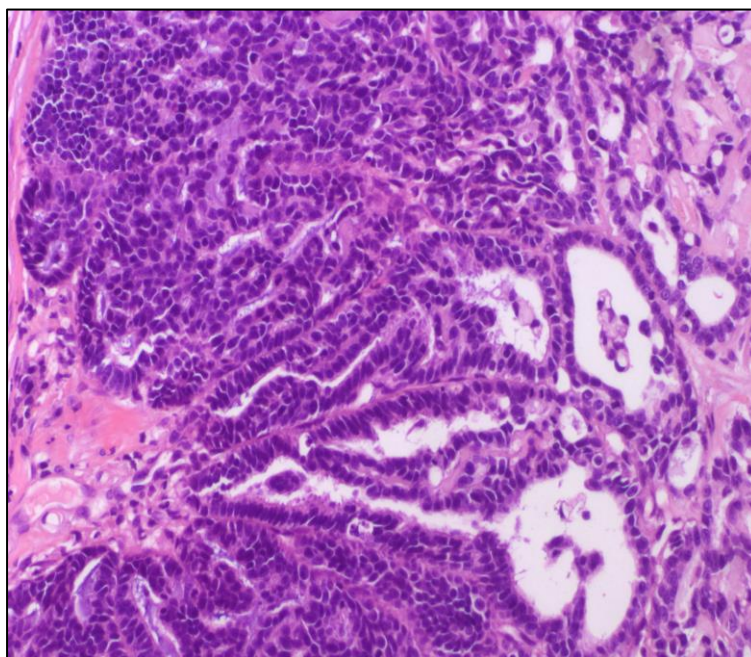


Figura 4. Imagen histopatológica de un carcinoma mamario en una de las gatas del estudio. Estructuras tubulares con delicado estroma de soporte y tapizadas por células poligonales con escaso citoplasma y núcleo hiper cromático. Hematoxilina y eosina, 20X.

El diagnóstico fue citológico en las cuatro gatas que se presentaron con recidivas y en dos de los trece tumores “de novo”, siendo histopatológico en el resto de los casos con tumores “de novo”. En total seis de los diecisiete casos fueron diagnosticados mediante citología. Los criterios más frecuentemente descritos en estas muestras incluían presencia de células multinucleadas, núcleos hiper cromáticos, pleomorfismo, nucléolos prominentes, anisocitosis, así como

figuras mitóticas en algunos casos dentro de un fondo de células inflamatorias (Figura 5).

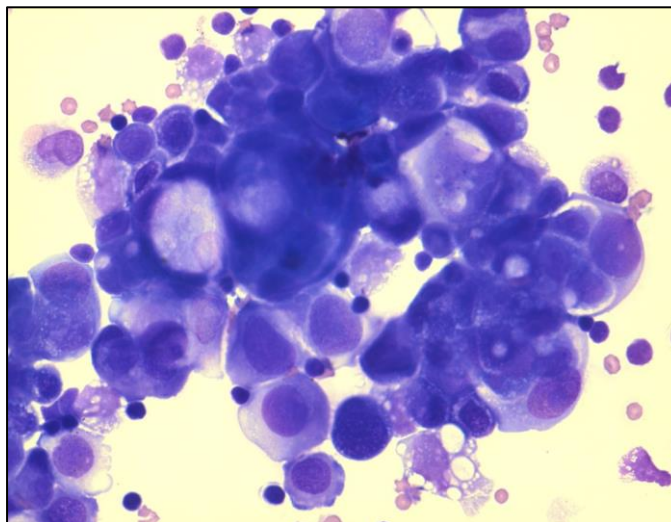


Figura 5. Imagen de una citología de una punción con aguja fina de una de los tumores mamarios. El predominio de grupos de células epiteliales glandulares pleomórficas con criterios nucleares de malignidad (anisocariosis, macrocariosis, macronucléolos) es indicativo de un carcinoma.

El resumen del tipo de método diagnóstico y hallazgos anatomopatológicos de las lesiones de los gatos se puede observar en la **Tabla 6**.

Tres gatas presentaron metástasis a distancia, una gata en zona del ganglio axilar y ganglio esternal, una en el ganglio axilar y una en el ganglio inguinal, todas diagnosticadas mediante punción con aguja fina (PAF) y citología. La gata que presentó metástasis en la zona del ganglio axilar y ganglio esternal fue diagnosticada mediante la realización de un TAC de la zona de la cavidad torácica. Las muestras para la realización de la citología se obtuvieron mediante PAF ecoguiada. Ninguna de las gatas presentó evidencia de metástasis en las radiografías torácicas. En el caso de las ecografías las únicas anomalías que se detectaron fueron: engrosamiento focal de la capa muscular del intestino delgado en 3 casos y en otro caso un nódulo hipoecoico de 1 cm en bazo. Este nódulo se investigó mediante PAF ecoguiada sin que se detectasen células con criterios de malignidad o compatibles con metástasis de un carcinoma. La muestra fue compatible con la celularidad normal de un bazo.

Tabla 6. Descripción del método diagnóstico y características histopatológicas de las gatas incluidas en este estudio.

Caso	Toma de muestra diagnóstico	Grado	Subtipo histológico
1	Biopsia tipo "punch"	Grado II	Sólido
2	Biopsia en cuña	Grado II	Tubulopapilar
3	Citología		
4	Biopsia tipo "punch"	Grado III	Sólido
5	Citología		
6	Citología		
7	Biopsia tipo "punch"	Grado II	Sólido
8	Biopsia tipo "punch"	Grado III	
9	Biopsia en cuña	Grado III	
10	Biopsia tipo "punch"	Grado III	Sólido
11	Citología		
12	Citología	ACA III post mortem	
13	Biopsia tipo "punch"	Grado III	Tubulopapilar
14	Biopsia tipo "punch"	Grado II	
15	Citología		
16	Biopsia tipo "punch"	Grado III	Tubulopapilar
17	Biopsia tipo "punch"	Grado II	Tubulopapilar

De las diecisiete gatas ninguna presentó patologías concomitantes que les impidiese ser incluidas en el estudio y estaban clínicamente sanas al diagnóstico. Dos gatas presentaron estadio 2 de la clasificación de IRIS basada en la creatinina (IRIS 2016). Se realizó hemograma a todas las gatas. El hematocrito varió de 24 a 48% (rango de referencia, 32 a 52%). La media fue de 37.2% siendo cuatro los pacientes que se presentaron con anemia leve (hematocrito 25-35%) (23.5%). El recuento de glóbulos blancos total varió de 4,5 a 22,3 X 10³/μl (rango de referencia, 2.87-17.02 X 10³/μl). En total 4 de 17 casos (23.5%) se presentó con leucocitosis. Seis gatas presentaban elevación de los valores de glucosa, otra gata elevación leve de la enzima ALT y otra elevación leve del valor de urea. La **Tabla 7** destaca los hallazgos más relevantes en el estadiaje inicial de las gatas incluidas en el estudio.

Tabla 7. Hallazgos clínicos y analíticos más relevantes obtenidos en las gatas durante las pruebas de estadiaje.

Caso	Ecografía	Hemograma	Bioquímica	Metástasis
1	Zona de 3 cm en yeyuno con engrosamiento focal de la capa muscular	Anemia normocítica normocromica no regenerativa moderada 24% Hematocrito	Glucosa 186 mg/dl	No
2	Normal	Normal	Glucosa 167 mg/dl	No
3	Normal	Normal	Creatinina 1.4 mg/dl	No
4	Normal	Leucocitosis 21500 K/ μ l	Normal	No
5	Normal	Anemia normocítica normocromica no regenerativa leve 30%	Glucosa 198 mg/dl	No
6	Engrosamiento focal segmento ileón sin perdida de diferenciación de capas	Anemia normocítica normocromica no regenerativa leve 31%	Normal	No
7	Normal	Normal	Normal	No
8	Normal	Normal	Glucosa 157 mg/dl	No
9	Normal	Normal	Creatinina 1.6 mg/dl Glucosa 174 mg/dl	No
10	Normal	Leucocitosis 22340 K/ μ l	Normal	No
11	Normal	Normal	Normal	No
12	Duodeno segmento distal con leve engrosamiento de capas sin perdida de diferenciación.	Anemia normocítica normocromica no regenerativa leve 31% hematocrito	Glucosa 152 mg/dl	No
13	Normal	Leucocitosis 23450 K/ μ l	ALT 88 U/l	Ganglio axilar y esternal
14	Normal	Anemia normocítica normocromica no regenerativa leve 29% hematocrito	Urea 35 mg/dl	No
15	Nódulo hipoecoico 1 cm en bazo	Normal	Normal	Ganglio axilar
16	Normal	Normal	Normal	Ganglio inguinal
17	Normal	Normal	Normal	No

Valores normales de referencia: Hematocrito 32-52%. ALT 22-84 U/l. Urea 17.6-32.8 mg/dl; Contaje glóbulos blancos 2.87-17.02 K/ μ l; Creatinina 0.8-1.8 mg/dl; Glucosa 71-148mg/dl

1.2 Tratamiento con fosfato de toceranib y efectos adversos

Cuatro gatas habían recibido tratamientos previos al inicio del estudio. En dos casos doxorubicina a 1mg/kg IV en bolo de 3-5 minutos cada 3 semanas y en otros dos casos docetaxel a 2,25 mg/kg en 1 h de infusión IV cada 3 semanas.

En todos los casos el tumor había progresado a pesar del tratamiento. En los cuatro casos las gatas habían recibido dos dosis del fármaco en cuestión

(doxorubicina o docetaxel) separados 3 semanas y en la visita que correspondería a la tercera dosis del protocolo se determinó la enfermedad progresiva proponiéndoles la inclusión en este estudio.

La dosis media administrada de fosfato de toceranib fue 2.77 mg/kg (rango: 2.3–3.2 mg/kg) administrado por vía oral cada 48 h. En tres gatas se tuvo que reformular el fosfato de toceranib para el peso del gata ya que con las presentaciones comerciales no se podía dosificar en el rango de dosis estipulado en el estudio. La **Tabla 8** detalla las dosis utilizadas en cada paciente y si se tuvo que reformular el fármaco.

Tabla 8. Tratamientos previos en los pacientes y dosis administrada de fosfato de toceranib.

Caso	Tratamiento medico previo	Dosis de fosfato de toceranib recibida mg/kg	Reformulación
1	Ninguno	2.8	
2	Docetaxel 2.25 mg/kg cada 3 semanas (dos dosis)	2.3	
3	Ninguno	3.0	
4	Ninguno	2.6	Si
5	Doxorubicina 1mg/kg IV cada 3 semanas (dos dosis)	2.6	Si
6	Ninguno	3.2	
7	Docetaxel 2.25 mg/kg cada 3 semanas (dos dosis)	2.3	
8	Ninguno	2.7	
9	Ninguno	3.1	
10	Ninguno	2.8	
11	Ninguno	2.6	
12	Ninguno	2.5	
13	Ninguno	3.0	
14	Ninguno	2.9	Si
15	Doxorubicina 1 mg/kg IV cada 3 semanas (dos dosis)	3.1	
16	Ninguno	2.4	
17	Ninguno	2.8	

Ocho de las diecisiete gatas mostraron algún tipo de toxicidad durante el tratamiento. Tres gatas presentaron alteraciones hematológicas leves (neutropenia grado 1 VCOG, Los cambios bioquímicos se observaron en dos gatas y en ambas fueron elevaciones de las enzimas hepáticas de grado 2 según VCOG en ambos casos. Una gata presentó vómitos grado 2 según VCOG y dos gatas anorexia, una grado 1 y otra grado 3 manejándose esta última disminuyendo la frecuencia de la administración a Martes y Sábado. La **Tabla 9** resume los efectos secundarios observados durante el tratamiento con fosfato de toceranib.

Tabla 9. Efectos secundarios observados en las gatas durante el tratamiento con fosfato de toceranib según criterios VCOG .

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Vómitos	1	-	-	-	-
Elevación ALT	-	2	-	-	-
Neutropenia	3	-	-	-	-
Anorexia	1	-	1	-	-

*Solo el episodio de anorexia grado 3 requirió detener la administración del fármaco 2 días y se redujo la frecuencia de administración a martes y sábado durante el resto del protocolo.

1.3 Evaluación de la respuesta

Para analizar la respuesta al tratamiento, se realizaron mensualmente mediciones objetivas del tumor usando el diámetro más largo mediante la utilización de un pie de rey según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015) y se definieron los diferentes tipos de respuesta tal y como se describen en el apartado de Material y Métodos.

Se detectó una respuesta completa, 5 respuestas parciales, seis gatas con enfermedad estable y cinco gatas con enfermedad progresiva (**Figura 6**).



Figura 6. Imagen correspondiente a un tumor mamario de una de las gatas del estudio. A la izquierda se muestra el tamaño de la lesión antes de comenzar el tratamiento y a la derecha 1 mes después de comenzar el tratamiento donde se puede apreciar una respuesta parcial además de una mejoría de la ulceración.

En uno de los casos además de las mediciones de la masa primaria también se pudo evaluar la respuesta de las lesiones metastásicas mediante la realización de un TAC de control a los 30 días de comenzar la terapia (**Figura 7**). Esta gata a

pesar de que la masa redujo un 22% en su diámetro más largo no se pudo incluir en la clasificación de respuesta parcial y se determinó como enfermedad estable.

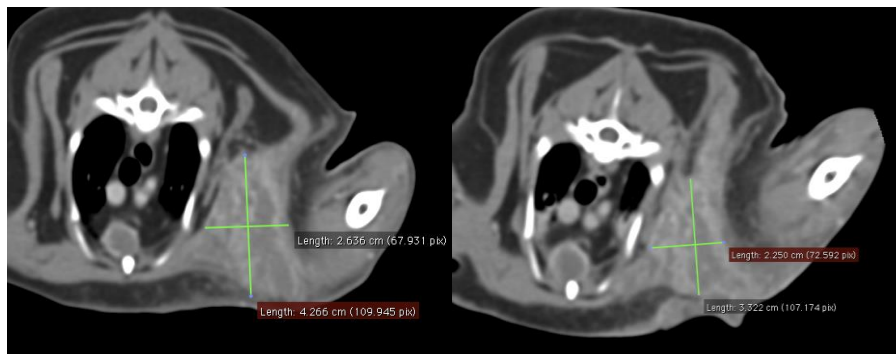


Figura 7. Imágenes transversales de tomografía computerizada post-contraste en ventana de tejido blando. En la imagen de la derecha se observa clara reducción del tamaño de la linfadenopatía esternal y la masa metastásica axilar izquierda tras el tratamiento con una reducción del diámetro más largo de la masa axilar de un 22% considerándose enfermedad estable según criterios RECIST.

En la **Tabla 10** se muestran los principales resultados de las respuestas al tratamiento con fosfato de toceranib en gatas.

Tabla 10. Respuesta siguiendo criterios RECIST al mes del tratamiento con fosfato de toceranib.

CASO	Respuesta RECIST
1	Enfermedad Estable
2	Respuesta Parcial
3	Enfermedad Progresiva
4	Enfermedad Estable
5	Respuesta Parcial
6	Enfermedad Progresiva
7	Enfermedad Estable
8	Enfermedad Estable
9	Respuesta Parcial
10	Enfermedad Progresiva
11	Respuesta Completa
12	Enfermedad Estable
13	Respuesta Parcial
14	Enfermedad Estable
15	Respuesta Parcial
16	Enfermedad Progresiva
17	Enfermedad Progresiva

Siguiendo el método de Kaplan-Meier la supervivencia mediana libre de progresión (SLP) fue de 91 días, considerándose como el tiempo desde el inicio del

tratamiento hasta que se detectó progresión (**Figura 8**). La mediana de supervivencia global considerándose como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la muerte por cualquier causa fue de 145 días (**Figura 9**). No hubo ningún paciente eliminado del análisis estadístico por perderse el seguimiento o abandono del estudio por cualquier otra causa.

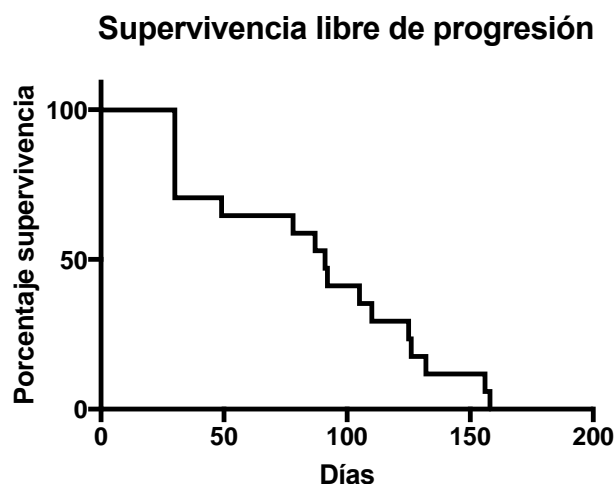


Figura 8. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia mediana libre de progresión en diecisiete gatas con adenocarcinomas de glándula mamaria tratados con fosfato de toceranib. Los números en el eje vertical representa la proporción de gatas que sobreviven libres de progresión. Los días en el eje horizontal representan el tiempo del inicio del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad. La mediana fue de noventa y un días.

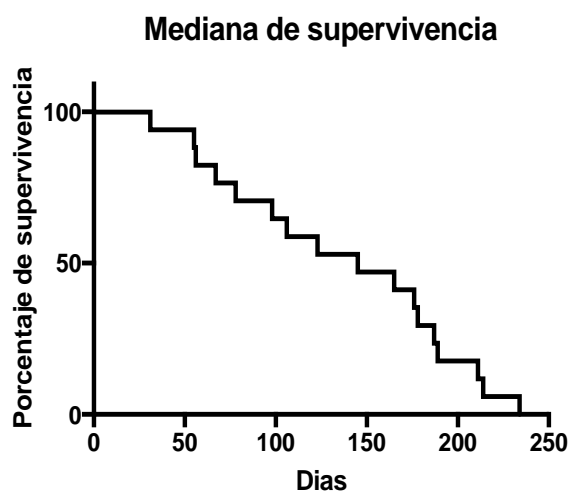


Figura 9. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global en diecisiete gatas con adenocarcinomas de glándula mamaria tratados con fosfato de toceranib. Los números en el eje vertical representa la proporción de gatas que sobreviven. Los días en el eje horizontal representan el tiempo del inicio del tratamiento hasta la muerte. La mediana de supervivencia fue de 145 días

Una de las gatas a pesar de mantener una remisión parcial en el tumor primario, su enfermedad progresó el día 43 de inicio del tratamiento debido a la presencia de un derrame pleural maligno. La gata presentó distrés respiratorio agudo y al acudir a nuestro centro se le realizaron dos radiografías torácicas (**Figura 10**) que confirmaron la presencia de derrame pleural.

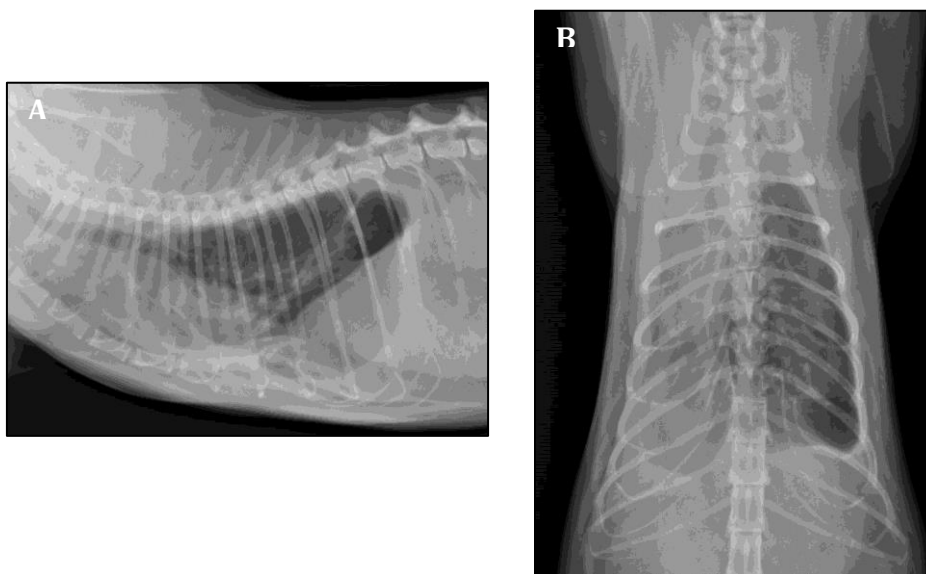


Figura 10. Radiografía lateral (A) y ventrodorsal (B) de la gata con remisión parcial según criterios RECIST en su masa primaria, que progresó a distancia con derrame pleural. Se aprecia un aumento moderado de líquido pleural en ambos hemitórax lo cual resulta en retracción de los lóbulos pulmonares. La silueta cardiaca esta oscurecida por el líquido pleural. La tráquea esta desplazada dorsalmente y hacia la derecha, y los lóbulos pulmonares craneales están desplazados caudalmente.

La gata se sedó con butorfanol a 0.3mg/kg/IV y recibió oxigenoterapia estabilizándola para después drenar el tórax. Se realizó una citología del líquido libre donde se pudieron apreciar múltiples “clusters” de células epiteliales con criterios de malignidad confirmando derrame pleural maligno y enfermedad metastásica progresiva (**Figura 11**).

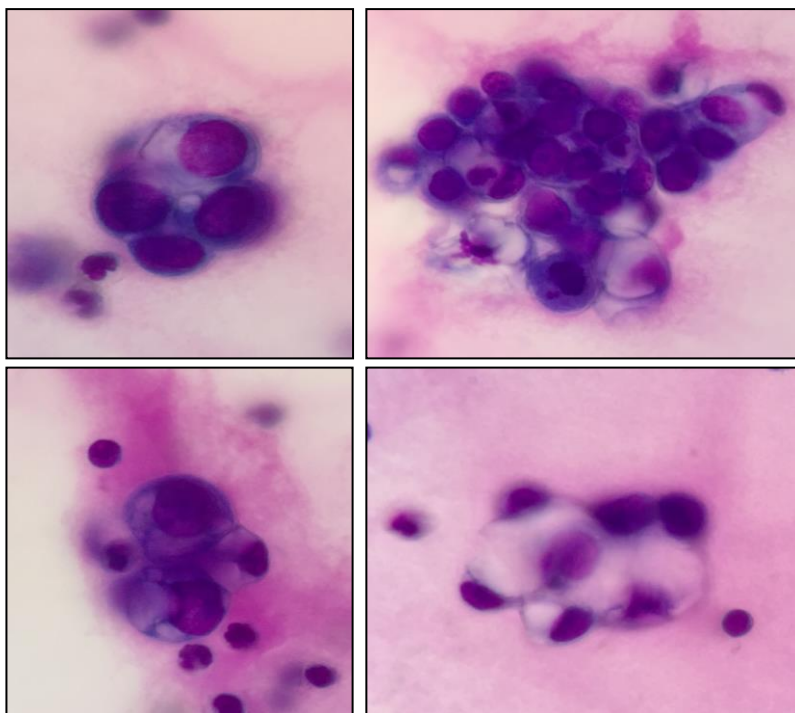


Figura 11. Imágenes de citología correspondientes al examen directo del líquido pleural del caso de la Figura 10. El animal se presentó con derrame pleural maligno, donde se pueden apreciar la presencia de numerosos “clusters” de células epiteliales con múltiples criterios de malignidad incluyendo células en forma de “anillo de sello” con desplazamiento del núcleo a la periferia por vacuolas ocupando el citoplasma.

1.4 Seguimiento y tratamientos posteriores

En todos los casos al determinarse la enfermedad progresiva se les ofreció tratamientos alternativos con otros citostáticos e incluso la inclusión en otro estudio clínico evaluando la actividad de docetaxel como monoterapia (Escriche *et al.*, 2016). Cuatro gatas después de presentar enfermedad progresiva y salir del estudio recibieron docetaxel a 2.25 mg/kg por vía IV en infusión de una hora cada tres semanas, mientras que una gata comenzó un protocolo con doxorubicina a 1 mg/kg por vía IV cada tres semanas. En el caso de las gatas con docetaxel solo uno de ellas respondió a la terapia con una RP mientras que dos gatas consiguieron EE y una EP. La gata tratada con doxorubicina solo llegó a recibir una dosis realizándose la eutanasia por decisión de los dueños ante la percepción de una reducción en su calidad de vida.

En la **Tabla 11** se muestran los tratamientos de rescate así como los principales resultados y la causa de la muerte de las gatas que participaron en el estudio.

Tabla 11. Tratamientos de rescate y causa de la muerte de las gatas del estudio

Caso	Tratamiento de rescate	Respuesta RECIST	Causa muerte
1	Docetaxel (3 dosis)	Enfermedad Estable	Metástasis pulmonares
2	Ninguno		Derrame pleural maligno
3	Ninguno		Metástasis pulmonares
4	Doxorubicina (1 dosis)	No evaluada	Ulceración/ progresión local
5	Ninguno		Ulceraciones/Infección
6	Ninguno		Ulceración tumor/ progresión local
7	Ninguno		Derrame pleural maligno
8	Ninguno		Ulceración tumor y calidad de vida
9	Ninguno		Ulceración/ progresión local
10	Ninguno		Metástasis pulmonares
11	Ninguno		Metástasis pulmonares
12	Docetaxel (2 dosis)	Enfermedad Progresiva	Deterioro calidad de vida
13	Ninguno		Deterioro calidad de vida
14	Docetaxel (4 dosis)	Respuesta Parcial	Metástasis pulmonares
15	Ninguno		Deterioro calidad de vida
16	Docetaxel (3 dosis)	Enfermedad Estable	Metástasis pulmonares
17	Ninguno		Metástasis pulmonares

Ninguna de los gatas fue eliminada del estudio estadístico de supervivencia mediana global o supervivencia mediana libre de progresión por no poder realizar un correcto seguimiento. Ninguna de las gatas estaba viva al concluir el estudio a los tres años del comienzo del mismo y en todos los casos los gatas fallecieron debido a la progresión de la enfermedad junto a una percepción por parte de los dueños de que su calidad de vida se había deteriorado en los días previos a la realización de la eutanasia. En aquellos casos que dejaron de acudir a nuestro centro para las visitas sucesivas, se habló vía telefónica con el veterinario responsable del caso para que nos informase del estado del animal, y mandase el historial completo de las últimas visitas. En todos los casos hubo un seguimiento completo así como causa de la muerte de la gata.

En siete casos la causa de la muerte fue la presencia de metástasis pulmonares, en dos casos derrame pleural maligno (confirmado citológicamente en ambos), en cinco casos la progresión de la masa primaria fue el motivo de la eutanasia al no poder controlar las infecciones y/o sangrados debidos a la progresión local de la enfermedad. En la **Figura 12** se pueden apreciar ejemplos de dos gatas con estadio final de la enfermedad con una masa de gran tamaño,

metástasis pulmonares y en otro caso la presencia de derrame pleural. En las otras tres gatas los dueños percibieron una disminución en la calidad de vida con apatía y anorexia siendo las principales razones por la que los dueños decidieron eutanasiar. En total catorce gatas fueron eutanasiadas y tres fallecieron en casa o antes de llegar al hospital. Solo se realizó una necropsia en uno de los casos donde la causa de la eutanasia fue la ulceración del tumor e infecciones, pudiendo confirmar el diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma y el grado, sin detectar presencia de metástasis a distancia.

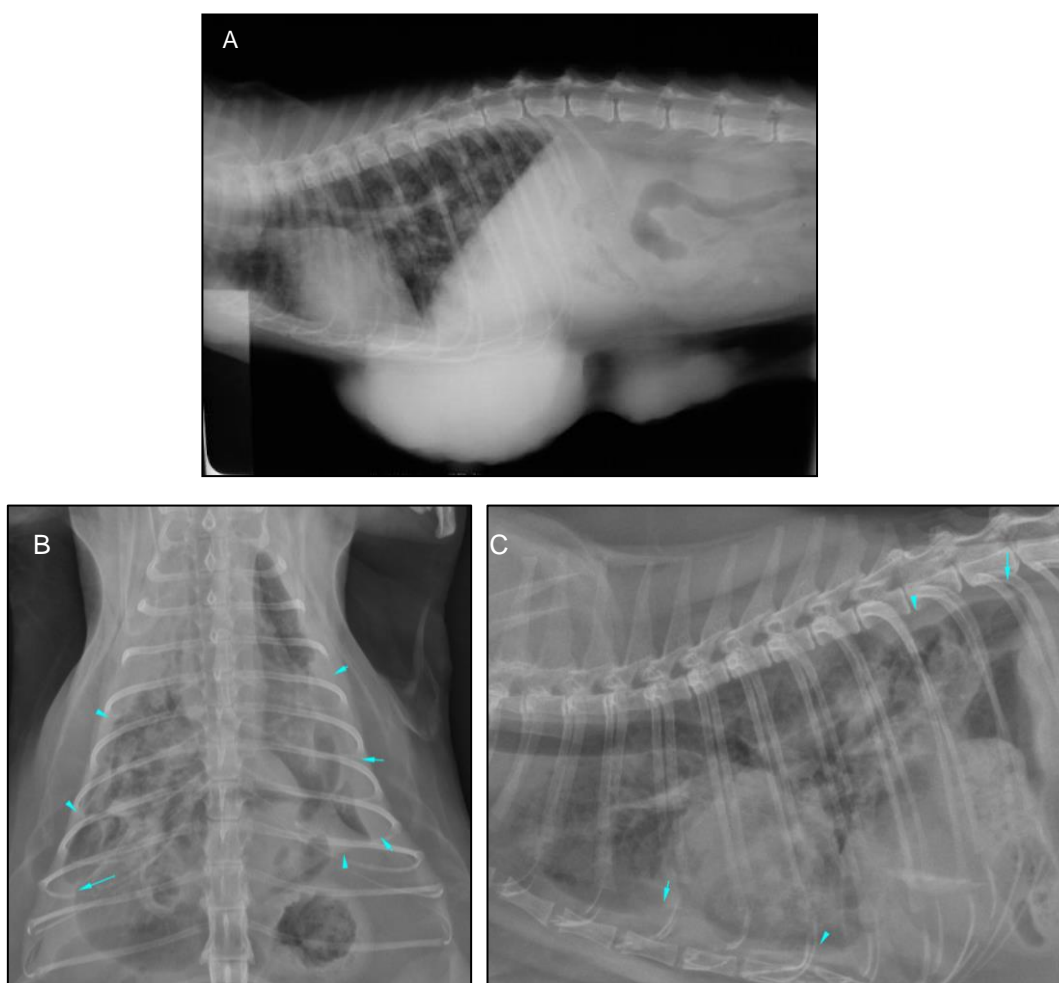


Figura 12. Ejemplos de progresión de la enfermedad en dos pacientes causando que los dueños optasen por la realización de la eutanasia (A) En la radiografía lateral se observan dos masas lobuladas en el tejido mamario. A nivel pulmonar hay múltiples nódulos poco definidos que representan metástasis del adenocarcinoma mamario. **(B,C)** Efusión pleural bilateral (flechas): retracción de los lóbulos pulmonares por acúmulo de líquido en espacio pleural. A nivel pulmonar se observan lesiones alveolares multifocales y nódulos poco definidos que representan enfermedad metastásica.

ESTUDIO DEL FOSFATO DE TOCERANIB Y CARPROFENO EN CARCINOMAS INFLAMATORIOS CANINOS.

A continuación se presentan los resultados correspondientes al estudio prospectivo con la combinación de fosfato de toceranib y carprofeno en perros evaluando la eficacia antitumoral, tolerabilidad de la combinación y calidad de vida de las perras que participaron en el estudio.

2.1 Población del estudio

Quince perras cumplieron los criterios de inclusión del estudio, descritos en Material y Métodos mientras que tres perras no pudieron incluirse al no presentar lesiones medibles según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015). En total, de todos los animales que fueron evaluados como candidatos al estudio en el tiempo de duración del estudio 3 de 18 (16%) no se pudieron incluir debido a esta causa. En la **Tabla 12** se resumen las principales características de los perras incluidas en el estudio.

Tabla 12. Reseña de las perras que participaron en el estudio.

Caso	Edad (años)	Peso (Kg)	Raza	Esterilizada	Años desde Esterilización	Tipo de CI
1	9	15.5	Mestizo	No		Primario
2	13	23.3	Mestizo	No		Primario
3	14	22.4	Mestizo	Si	10	Primario
4	12	42.6	Mastín	Si	11	Primario
5	16	13.5	Mestizo	No		Primario
6	11	6.1	Yorkshire Terrier	No		Primario
7	8	3.3	Yorkshire Terrier	Si	7	Primario
8	11	15.5	Mestizo	No		Primario
9	13	42.7	Mestizo	Si	1	Primario
10	12	9.1	Bulldog Francés	No		Primario
11	8	27.8	Labrador	No		Secundario
12	14	33.9	Rottweiler	Si	5	Primario
13	8	14.2	Cocker Spaniel	Si	7	Primario
14	15	28.6	Pastor Alemán	Si	5	Secundario
15	10	29.9	Boxer	No		Secundario

Las perras en este estudio fueron evaluadas desde Enero de 2013 hasta Junio de 2016. La edad media en el examen inicial fue de 11.6 años (con un rango de 8-16 años). El peso medio fue de 21.8 kg (con un rango de 3.3 a 42.7 kg). Se

incluyeron en el estudio seis perras de la raza mestiza (40%), dos Yorkshire Terrier (13%), y una sola perra (6.6%) de las siguientes razas: Bulldog Francés, Labrador, Rottweiler, Cocker Spaniel, Pastor Alemán, Mastín y Boxer. Siete hembras estaban esterilizadas (46.6%) en el momento de inclusión y la media de años desde la esterilización fue de 6.5 años. Doce perras (80%) se presentaron con un carcinoma inflamatorio canino (CIC) primario y tres (20%) presentaron un CIC secundario donde se había realizado una cirugía previa con diagnóstico de histopatología diferente al de CIC. Dos perras se presentaron con una recidiva de CI después de una intervención previa realizada en otro centro. Ninguna de las perras había recibido tratamientos hormonales previos.

El tamaño medio de los tumores al diagnóstico fue de 5.79 cm teniendo en cuenta el diámetro más largo. Nueve perras (60%) presentaron las lesiones en las mamas inguinales y seis perras (40%) en las axilares. En nueve perras (60%) los tumores afectaron al menos a 2 mamas mientras que en seis perras (40%) la presentación afectó a una sola mama. Además de la presencia de una masa, los signos clínicos más frecuentes incluyeron eritema, calor y firmeza de las mamas en todos los casos (100%). Los siguientes signos clínicos más frecuentes considerándose lesiones no diana fueron la presencia de nódulos cutáneos en un 60% de los casos, linfadenopatía regional (53.4%), linfedema de las extremidades posteriores (26.6%), y ulceración de la masa (13.3%). En las **Figuras 13, 14 y 15** se pueden observar los signos clínicos más habituales de las perras que se presentaron en el estudio.



Figura 13. Imágenes representativas de las características macroscópicas más frecuentes observadas en las perras incluidas en este trabajo. En las fotos se pueden apreciar las características macroscópicas más frecuentes observadas en todos los casos incluyendo eritema y nódulos cutáneos.



Figura 14. Imagen representativa de una masa afectando la ultima mama inguinal izquierda y la zona inguinal con marcado eritema y afectación de la piel.



Figura 15. Imagen representativa de uno de los casos con marcado linfedema afectando a ambas extremidades posteriores siendo más marcada en la extremidad izquierda.

El resumen de las principales características macroscópicas de las lesiones de los perras se puede observar en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Características de los tumores en el examen físico

Caso	Localización lesiones	Otras características	Tamaño (cm)
1	I3-I4-I5	Linfedema. Nódulos piel	5.3
2	I3	Ulceración	5.4
3	D2-D3	Nódulos piel	6.6
4	D4-D5	Linfedema. Nódulos piel	4.7
5	I4-I5		5.5
6	D3	Lesiones piel	3.4
7	D1	Ulceración	2.3
8	I5-D5	Linfedema	6.7
9	D1	Lesiones piel	5.6
10	I3-I4	Lesiones piel	4.6
11	I2-I3		8.4
12	D4		9.6
13	I2-I3	Nódulos piel	3.4
14	I4-I5	Linfedema. Nódulos piel	8.7
15	D4	Nódulos piel	6.7

En trece casos se obtuvo el diagnóstico histopatológico mediante una biopsia incisional mientras que en dos de los casos se trató de una recidiva de un CI recientemente operado del cual se disponía de un análisis histopatológico. En todos los casos se pudo detectar histopatológicamente el patrón típico de afectación dermal ya descrito en los CIC (Peña *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2010), tal y como se observa en la **Figura 16**.

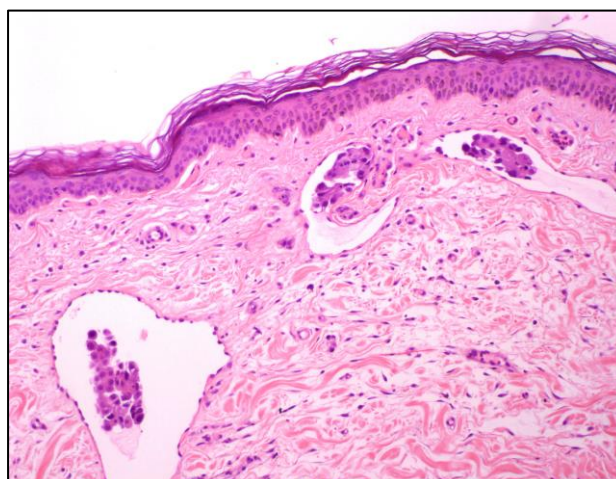


Figura 16. Muestra de un corte histológico de piel, tras tinción con Hematoxilina y eosina (10x). Se observan los vasos linfáticos en la dermis superficial con émbolos intraluminales de células neoplásicas epiteliales, consistente con el diagnóstico de CIC.

En diez perras se realizó una biopsia incisional tipo “punch”, mientras que en tres fue una biopsia en cuña/elipse, tal y como se describe en Material y Métodos. En las tres perras que se realizó una biopsia en cuña/elipse se produjeron complicaciones. En una de las perras se produjo una hemorragia difícil de contener, requiriendo incluso la hospitalización y administración de hemoderivados que permitieron dar el alta al paciente al día siguiente. En los tres casos se produjo una dehiscencia de la herida. En el caso de las perras en los que se realizó una biopsia tipo “punch” solo en una (10%) se produjo una infección y ulceración de la zona biopsiada, resuelta con administración de antibioterapia y limpieza y desinfección diaria de la herida. El resumen de los tipos de biopsia realizados así como las complicaciones asociadas se puede observar en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Descripción del tipo de biopsia realizada a las perras para el diagnóstico y complicaciones asociadas.

Caso	Tipo biopsia	Complicaciones
1	Biopsia tipo “punch”	Infección, dehiscencia, ulceración
2	Primera cirugía convencional	
3	Biopsia tipo “punch”	
4	Biopsia tipo “punch”	
5	Biopsia tipo “punch”	
6	Biopsia tipo “punch”	
7	Primera cirugía convencional	
8	Biopsia tipo “punch”	
9	Biopsia tipo “punch”	
10	Biopsia tipo “punch”	
11	Biopsia tipo “punch”	
12	Biopsia en cuña	Dehiscencia/hemorragia-transfusión-hospitalización
13	Biopsia en cuña	Úlcera difícil de controlar
14	Biopsia en cuña	Dehiscencia/hemorragia
15	Biopsia tipo “punch”	

La **Tabla 15** destaca los hallazgos analíticos y clínicos más relevantes en el estadiaje inicial de las perras incluidas en el estudio. Se realizó hemograma a todas las perras. El hematocrito varió de 29 a 48% (rango de referencia, 37 a 61%). La media fue de 41.2% siendo cuatro los pacientes que se presentaron con anemia leve (26.6%). El recuento de glóbulos blancos total varió de 5,2 a 32,1 X 10³/μl (rango de referencia: 5 a 16.7 X 10³/μl). En total 11 de 15 casos (73.3%) se presentaron con leucocitosis (rango de referencia: 2.87-17.02 X 10³/μl). Cinco pacientes (33%) se presentaron con aumentos en FA habiendo recibido corticoides cuatro pacientes. Dos pacientes presentaron aumentos de colesterol y uno un aumento de la enzima ALT.

Tras el análisis anatomopatológico/histológico se pudo detectar mediante citología metástasis ganglionar locoregional en cuatro casos (26.6%), y en ganglios abdominales iliacos en otros cuatro casos (26.6%). En todos los casos se pudo apreciar una población de células epiteliales con múltiples criterios de malignidad dentro de la población celular habitual de un ganglio. La **Figura 18** contiene imágenes de citología de algunas de las perras donde se diagnosticó la presencia de metástasis. La otra perra con metástasis a distancia presentó una lesión ósea agresiva en la diáfisis de la tibia al la altura del foramen nutricio que citológicamente se diagnosticó como carcinoma. En total se detectaron metástasis a distancia en seis perras (40%). Ninguna de los perras presentó metástasis macroscópicas en radiografías torácicas. Solo una de las perras presentó ligero aumento del ganglio esternal donde se realizó una sedación y PAF ecoguiado siendo la citología compatible con una ganglio reactivo. La **Figura 19** contiene algunos ejemplos de los hallazgos ecográficos o radiográficos de los casos diagnosticados con metástasis.

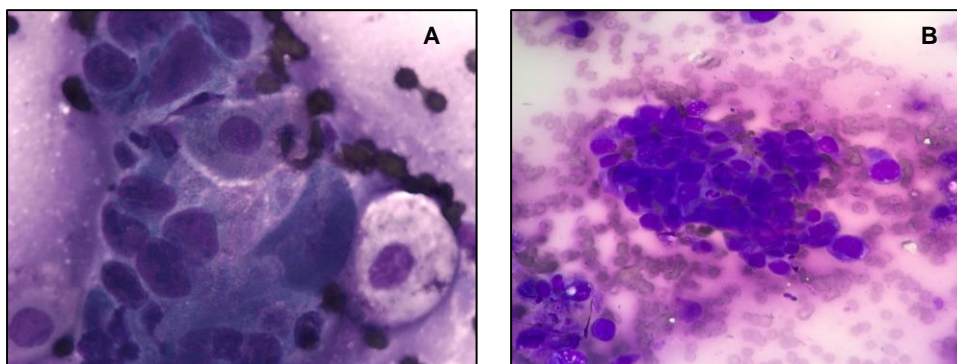


Figura 18. Hallazgos citológicos en PAF de CIC (A) Imagen de una citología después de punción con aguja fina (PAF) de un ganglio iliaco aumentado de tamaño en la ecografía abdominal (**Figura 19 C**). Se puede apreciar un “cluster” de células epiteliales, pleomorfismo, anisocariosis, elevada celularidad y alta basofilia. **(B)** Citología de una punción de la lesión ósea agresiva (**Figura 19 B**) mediante sedación y punción con aguja de calibre 18G. Las células se agrupaban en “clusters” presentando múltiples criterios de malignidad incluyendo anisocitosis, anisocariosis, células binucleadas, presencia de 1 a 2 nucléolos y frecuentes mitosis consistente con tumor maligno epitelial metastásico.

Tabla 15. Hallazgos clínicos y analíticos más relevantes obtenidos en las perras durante las pruebas de estadiaje.

Caso	Ecografía	Radiografías torácicas	Hemograma	Bioquímica	Urianálisis	Metástasis/Método diagnóstico
1	Ganglio iliaco 3 cm diámetro hipoeicoico	Ganglio esternal aumentado. Citología ganglio reactivo	Anemia leve no regenerativa normocítica normocrómica Hematocrito 31% Leucocitosis 18.23 K/μl	Normal	Normal	Ganglio iliaco/citología
2	Nódulo bazo 1.3 cm hipoeicoico/Citología PAF compatible con hiperplasia nodular benigna	Normal	Normal	ALT 97 U/l	Normal	Lesión ósea metastásica diátesis/citología
3	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No
4	Ambos ganglios Iliacos 3.4cm izquierdo y 4 cm el derecho	Normal	Leucocitosis 20.37 K/μl	Normal	Bacteria 2+	Ganglio inguinal iliaco/citología
5	Masa solitaria hígado 4 cm/ citología PAF compatible con carcinoma hepatocelular	Normal	Leucocitosis 17.1 K/μl	Colesterol 360 mg/dl	Normal	No
6	Normal	Normal	Leucocitosis 17.67 K/μl	Normal	Normal	No
7	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No
8	Ganglio iliaco 2.3 cm heterogéneo	Normal	Anemia leve no regenerativa normocítica normocrómica Hematocrito 31%	Normal	Normal	Ganglio poplíteo izquierdo/citología
9	Tumor adrenal izquierdo 2.1 cm/ PAF no realizado	Normal	Leucocitosis 21.98 K/μl	Colesterol 345 mg/dl	Bilirubina +1	No
10	Normal	Normal	Leucocitosis 32.1 K/μl	FA 230 U/l	Normal	No
11	Normal	Normal	Leucocitosis 17.6 K/μl	FA 346 U/l	Normal	No
12	Ganglio iliaco izquierdo heterogéneo 2.4 cm	Normal	Anemia leve no regenerativa normocítica normocrómica Leucocitosis 19.76 K/μl	Normal	Presencia de cristales de estruvita	Ganglio iliaco/citología
13	Normal	Normal	Leucocitosis 20.01 K/μl	FA 560 U/l	Normal	No
14	Normal	Normal	Hematocrito 32% Leucocitosis 18.65 K/μl	FA 670 U/l	Normal	Ganglio inguinal/citología
15	Nódulo bazo 1.6 cm/ Citología compatible con hematopoyesis extramedular	Normal	Anemia leve no regenerativa normocítica normocrómica 29% Leucocitosis 25.21 K/μl	FA 168 U/l	Normal	Ganglio inguinal/citología

Valores de referencia: Hematocrito 32-52%. ALT 22-84 U/l.. ALP 13-83 U/l

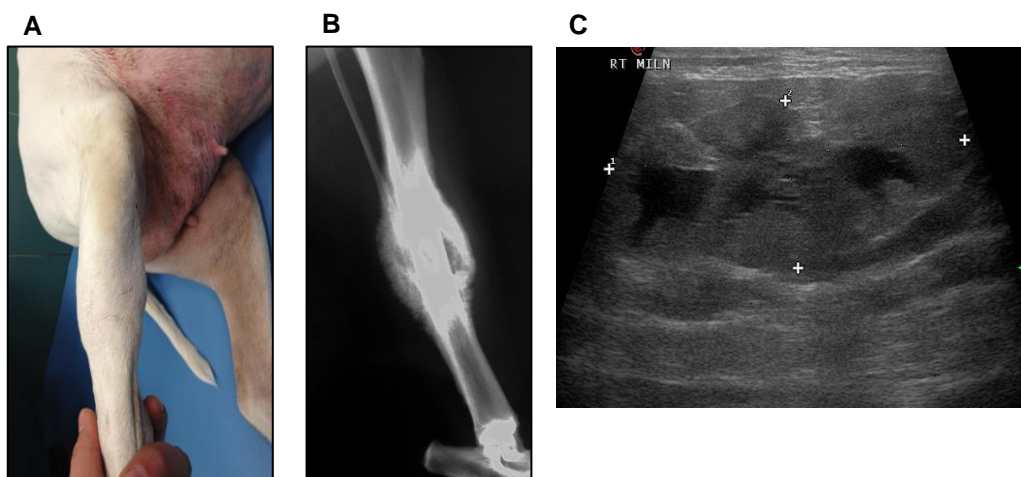


Figura 19. Diagnóstico por imagen en un caso de CIC. **A.** Imágenes correspondientes a una perra con CI secundario con una masa de consistencia firme en la diáfisis de la tibia derecha. Se puede observar el eritema e inflamación de las mamas inguinales afectadas. **B.** El estudio radiológico de la zona detectó una lesión ósea agresiva con neoformación y lisis ósea en la diáfisis de la tibia localización frecuente de lesiones óseas metastásicas. **C.** Imagen ecográfica del ganglio iliaco medio derecho donde se puede apreciar un marcado aumento de tamaño y aspecto heterogéneo con zonas anecoicas en su interior.

2.2 Tratamiento con fosfato de toceranib y efectos adversos

Tal y como se detalla en la **Tabla 16** ninguna de las perras había recibido tratamiento con quimioterápicos previamente a la inclusión en el estudio. Tres de las perras habían recibido AINEs (dos firocoxib y uno meloxicam) y hasta seis de las perras habían recibido algún tipo de corticoides (un caso dexametasona, otro metilprednisolona y cuatro prednisona). Cinco perras se encontraban recibiendo tramadol, que se continuó en todos los casos durante el resto del tratamiento sin interrupciones.

La dosis media de fosfato de toceranib utilizada fue de 2.61 mg/kg administrado por vía oral 3 veces a la semana (Lunes, Miércoles y Viernes). La dosis media de carprofeno utilizada fue de 4.25 mg/kg administrado por vía oral una vez al día.

Los propietarios completaron un cuestionario en cada visita (**Anexo 6**) que describía los signos clínicos presentados por la perra en su casa desde la visita anterior. Además recogían todos estos efectos secundarios gracias a un diario de efectos secundarios (**Anexo 7**) que se le proporcionó en cada consulta. Los eventos adversos se clasificaron utilizando los criterios VCOG-CTACE para los eventos adversos (VCOG 2011).

Tabla 16. Protocolo de administración del tratamiento a las perras incluidas en este estudio.

Caso	Tratamiento médico previo	Analgesia	Dosis de fosfato de toceranib recibida (mg/kg)	Dosis carprofeno (mg/kg/24h)
1	Ninguno	Tramadol	2.5	4.4
2	AINE (firocoxib)		2.5	4.2
3	Ninguno	Tramadol	2.9	4.4
4	AINE (firocoxib)		2.5	4.1
5	Ninguno	Tramadol	2.5	3.7
6	Ninguno		2.4	4.1
7	AINE (meloxicam)		3	4.5
8	Ninguno		2.5	4.2
9	Prednisona		2.5	4.1
10	Dexametasona	Tramadol	2.7	4.1
11	Ninguno	Tramadol	2.8	4.4
12	Prednisona		2.3	4.4
13	Metilprednisolona		2.4	4.4
14	Prednisona		2.3	4.4
15	Prednisona		2.6	4.4

Los efectos secundarios manifestados en los pacientes (**Tabla 17**) fueron en general leves y en ningún caso limitantes de dosis. Seis perras se saltaron la administración del fármaco en una ocasión cada uno por olvido (dos casos) o mientras que esperaban contactar con el hospital para consultar si los efectos secundarios que presentaba su mascota requerían detener la administración. El 60% de los perras presentaron algún efecto adverso de grado 1/2 sin ningún efecto adverso de tipo grado 3/4. Las más frecuentes fueron las toxicidades gastrointestinales (anorexia, vómitos y diarrea) 80%, hematológica (n=1) o cutánea (n=1) en la forma de hipopigmentación. No hubo cambios a reseñar en la bioquímica incluso disminuyendo el valor de la enzima hepática fosfatasa alcalina (FA) a rangos normales en cuatro de las cinco perras donde inicialmente estaba aumentada.

Tabla 17. Efectos secundarios observados en las perras durante el tratamiento con fosfato de toceranib según criterios VCOG

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Vómitos	1	-	-	-	-
Diarreas	-	3	-	-	-
Neutropenia	1	-	-	-	-
Anorexia	2	2	-	-	-
Hipopigmentación	1	-	-	-	-

2.3 Evaluación de la respuesta

La respuesta se determinó a través las mediciones objetivas usando el diámetro más largo del tumor medido con un pie de rey de manera mensual según criterios RECIST, tal y como se detalla en el apartado de Material y Métodos.

Catorce perras pudieron ser evaluadas al mes según criterios RECIST. No se detectó ninguna respuesta completa o parcial en ninguno de los perras a los 30 días. Nueve perras consiguieron mantener enfermedad estable (EE) (64%) al mes del tratamiento mientras que el resto de perras tuvieron enfermedad progresiva (EP) (36%). En la **Tabla 18** se muestran los principales resultados de la respuesta a la combinación.

Tabla 18. Respuesta siguiendo criterios RECIST al mes del tratamiento con fosfato de toceranib y carprofeno.

Caso	Respuesta RECIST
1	Enfermedad estable
2	Enfermedad estable
3	Enfermedad estable
4	Enfermedad estable
5	Fallecida
6	Enfermedad Progresiva
7	Enfermedad Progresiva
8	Enfermedad Progresiva
9	Enfermedad estable
10	Enfermedad estable
11	Enfermedad estable
12	Enfermedad estable
13	Enfermedad estable
14	Enfermedad estable
15	Enfermedad Progresiva

Dentro de las lesiones no diana, como eran el linfedema, rojez, firmeza y dolor en las lesiones, el clínico responsable del caso consideró que el linfedema mejoró en 2 de los 4 casos (50%), desapareciendo en las otros dos perras. En lo referente a los signos de dolor, eritema y firmeza de las lesiones, el clínico describió mejoría de al menos una variable en 12 perras (80%) a los 15 días y 10 (66%) a los 30 días del inicio de tratamiento. En las **Figuras 20 y 21** se aprecia la mejoría subjetiva en uno de los casos donde el eritema había mejorado así como la firmeza de las lesiones, sin que hubiese una respuesta siguiendo criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015).

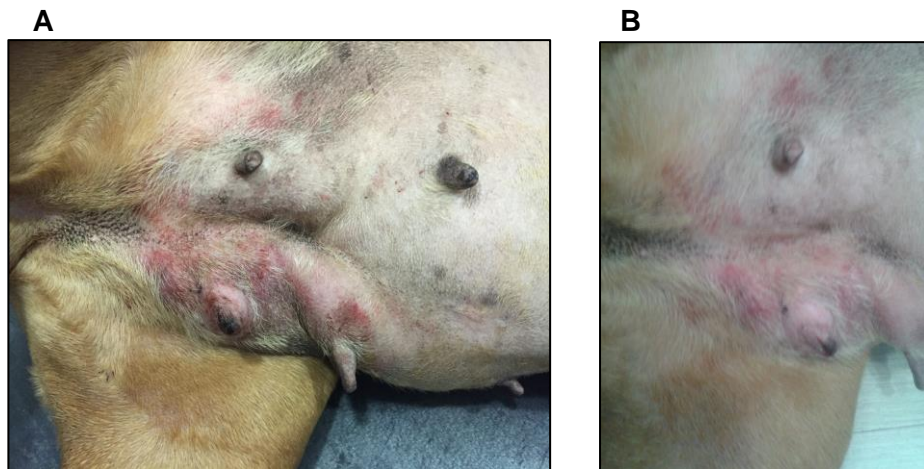


Figura 20. Presentación clínica caso CIC. A. Presencia de eritema y nódulos cutáneos en una perra con CI primario. **B.** Leve mejoría al mes de tratamiento en el grado de eritema, inflamación y firmeza.

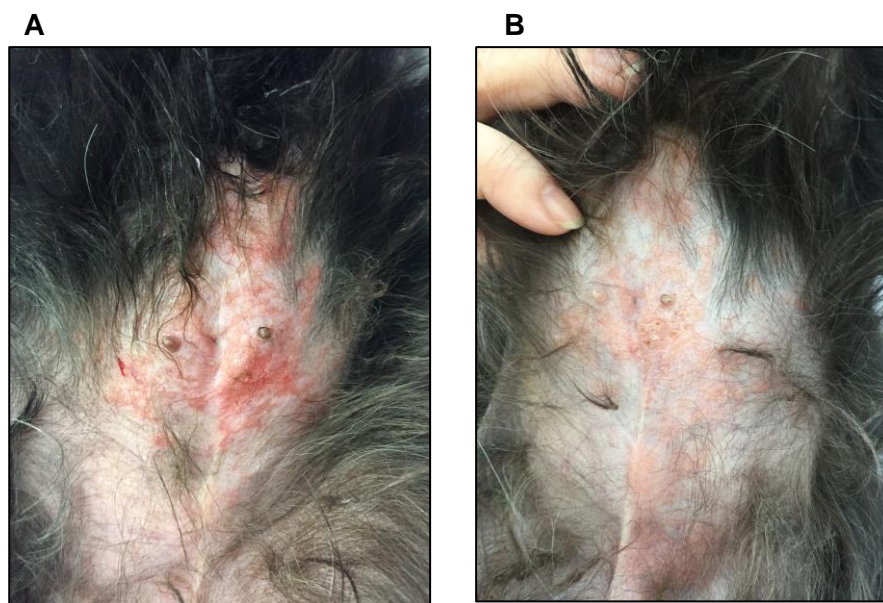


Figura 21. Presentación y respuesta del eritema en un caso de CIC. A. Presencia de eritema y nódulos cutáneos en una perra con CI primario. **B.** Leve mejoría al mes de tratamiento en el grado de eritema, inflamación y firmeza.

La supervivencia mediana libre de progresión (SLP) de la enfermedad según el análisis de Kaplan-Meier fue de 76 días, considerándose como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta que se detectó progresión (**Figura 22**). La mediana de supervivencia global considerándose como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la muerte por cualquier causa fue de 90 días (**Figura 23**). No hubo ningún paciente excluido del análisis estadístico por perderse el seguimiento o abandono del estudio por cualquier causa.

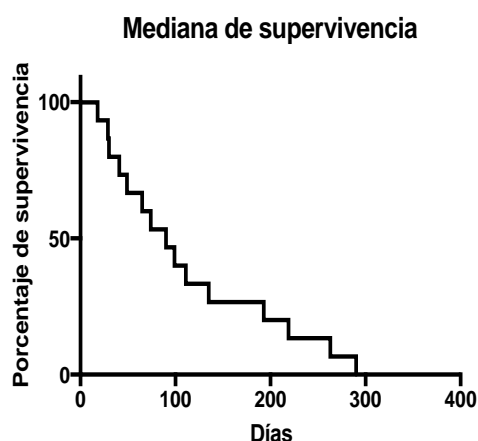


Figura 22. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global en quince perras con CI tratadas con fosfato de toceranib y carprofeno. Los números en el eje vertical representa la proporción de perros que sobreviven. Los días en el eje horizontal representan el tiempo del inicio del tratamiento hasta la muerte. La mediana de supervivencia fue de noventa días

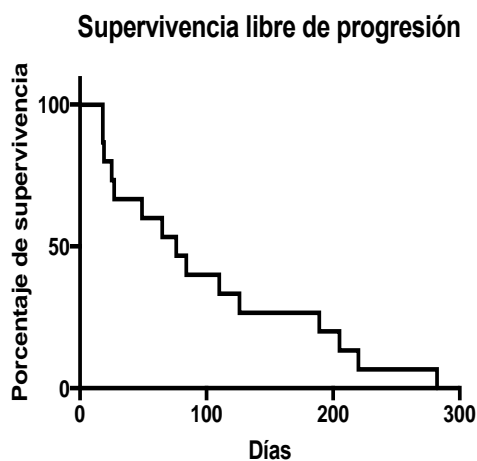


Figura 23. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia mediana libre de progresión en quince perras con CI tratados con fosfato de toceranib y carprofeno. Los números en el eje vertical representa la proporción de perras que sobreviven. Los días en el eje horizontal representan el tiempo del inicio del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad. La mediana fue de setenta y seis días

Nueve perras (60%) presentaron los criterios para incluirse en la definición de beneficio clínico que incluían una mejoría en la Escala de Evaluación Visual (EEV) en el cuestionario de calidad de vida y respuesta completa, respuesta parcial o enfermedad estable según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015) mantenida al menos un mes.

2.4 Calidad de vida

La calidad de vida se evaluó mediante el formulario de calidad de vida modificando ligeramente al descrito previamente por Lynch *et al.* (“Formulario del tratamiento del cáncer”) (**Anexo 6**).

Se analizaron los cambios en la calidad de vida evaluando varios parámetros entre el momento de la inclusión al estudio a los quince días en la primera visita de revisión y a los treinta días donde se evaluaba respuesta. El primer valor evaluado fue la medición según EEV de la calidad de vida por parte de los dueños al que se le asignaba un número del 0 al 10 siendo 1 una calidad de vida muy pobre y 10 una calidad de vida excelente.

Tal como se puede observar en la **Figura 24** se produjo un incremento significativo de la media de EEV para la calidad de vida entre el momento del diagnóstico (Media de EEV 3.66) y el día 15 (Media de EEV de 6.38) en el que se realizaba la primera visita ($P=0.0009$), así como entre el día del diagnóstico y el día 30 (6.75) ($P=0.001$), mientras que no hubo diferencias significativas entre el día 15 y 30 ($P=0.22$). La calidad de vida mejoró a los 15 y 30 días significativamente en los perros comparado con el comienzo de la terapia.

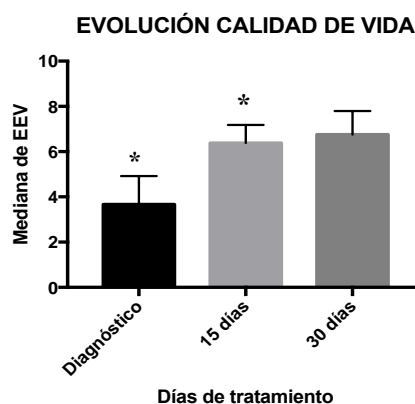


Figura 24. Resultados obtenidos tras la encuesta sobre la evolución de la calidad de vida en perras tratadas con fosfato de toceranib. Las anotaciones de los dueños en el formulario de calidad de vida se transformaron en valores del 0 al 10, donde 0 indicaba una calidad de vida muy pobre y 10 excelente. El asterisco indica diferencias significativas. Tanto a los quince días ($P=0.0009$) como a los treinta días ($P=0.001$), comparándolo con el momento del diagnóstico.

Teniendo en cuenta los parámetros individuales del cuestionario evaluando las ocho categorías más relevantes en la calidad de vida: felicidad, estado mental, dolor, apetito, higiene, ingesta de agua (hidratación), y movilidad (Finch *et al.*, 2011) se observaron mejorías significativas en varias de las preguntas de cada una de estas categorías comparando el momento del diagnóstico con las primeras revisiones a los quince y treinta días. Cada categoría se evaluaba mediante preguntas con respuestas en una escala de 1 a 5 siendo 1 muy desacuerdo y el 5 muy de acuerdo a la afirmación o pregunta formulada. En el caso de evaluación de la salud general se dividía de nuevo en dos preguntas comparándola con la visita anterior y con el comienzo del estudio valorándose también del 1 del 5 siendo 1 peor, 3 igual y 5 mejor.

Algunas de las categorías donde los dueños en al menos una de las preguntas percibieron mejoría y que fueron estadísticamente significativas incluyeron felicidad, estado mental, apetito y movilidad general. En concreto los dueños notaron y estaban más de acuerdo en que al mes del tratamiento sus mascotas querían jugar más ($P=0.049$), tenían mejores días que peores ($P=0.0059$), tenían menos dolor ($P=0.0020$), comían más su comida habitual ($P=0.0082$) y premios ($P=0.0115$), se movían con más facilidad ($P=0.0215$) y las notaban más activas que nunca ($P=0.0039$) comparado con el momento del diagnóstico. En el caso del estado de la salud los dueños describieron que sus mascotas tenían un mejor estado de salud general a los quince días ($P=0.0001$) y treinta días ($P=0.0005$) del diagnóstico.

En la **Tabla 19** se describen los principales resultados del cuestionario de vida. Se utilizó el test de Wilcoxon para comprobar diferencias en los valores pareados. Se compararon las medias del grupo de perras al diagnóstico frente a los 15 días y 30 días.

Tabla 19. Principales resultados del cuestionario de vida y los cambios en los valores medios de la población en cada categoría entre el momento del diagnóstico, a los 15 días y a los 30 días.

	Antes tratamiento	15 días	30 días
FELICIDAD			
Mi mascota quiere jugar	3	3.8* (P=0.0039)	4.2* (P=0.049)
Mi mascota responde a mi presencia	4.1	4.8 (P=0.0078)	4.2 (P=0.9)
Mi mascota disfruta de su vida	3.5	4.4* (P=0.0039)	4.2 (P=0,1250)
ESTADO MENTAL			
Mi mascota tiene mejores días que peores	3.0	4.2* (P=0.0010)	4.2* (P=0.0059)
Mi mascota duerme mas, esta despierta menos tiempo	2.6	1.7* (P=0.0010)	2 (P=0.12)
Mi mascota parece adormilada o deprimida, no alerta	2.5	1.6* (P=0.0010)	2.0 (P=0.273)
DOLOR			
Mi mascota tiene dolor	4	2.2* (P=0.0002)	2.2* (P=0.0020)
APETITO			
Mi mascota come su cantidad de comida habitual	2.7	3.8 (P=0.1675)	4.1* (P=0.0082)
Mi mascota parece que tiene nausea o vomita	1.0	1.4 (P=0.1875)	1.1 (P=0.9)
Mi mascota come premios o snacks	3.2	4.1 (P=0.12)	4.4* (P=0.0115)
TOMA DE AGUA (HIDRATACIÓN)			
Mi mascota bebe la misma cantidad de siempre	4.5	4.8 (P=0.06)	4.6 (P=0.9)
Mi mascota tiene diarrea	1.2	1.5 (P=0.5)	1.5(P=0.75)
Mi mascota orina la misma cantidad de siempre	4.8	4.733 (P=0.9)	4.7(P=0.75)
MOVILIDAD			
Mi mascota se mueve con facilidad	3.2	4* (P=0.0078)	4.1* (P=0.0215)
Mi mascota esta acostada todo el día	1.8	1.5 (P=0.218)	1.6 (P=0.9)
Mi mascota esta más activa que nunca	2.1	3.1* (P=0.0020)	3.1* (P=0.0039)
ESTADO DE SALUD GENERAL			
Estado de salud comparado con antes del diagnóstico de cáncer	2.3	4.2* (P=0.0001)	4.1* (P=0.0005)

2.5 Seguimiento y tratamientos posteriores

En todos los casos en que se observó progresión de la enfermedad se ofreció a los propietarios comenzar una terapia de rescate. En cinco casos eligieron la administración de doxorubicina a 30 mg/m² por vía IV lenta en al menos quince minutos cada tres semanas, mientras que en cuatro casos se decidió no administrar más tratamientos citotóxicos y solo continuar y/o mejorar el tratamiento paliativo/analgésico. En las cinco perras que comenzaron doxorubicina solo en un caso se administró más de una dosis del fármaco debido a la progresión de la

enfermedad o un empeoramiento en la calidad de vida de las perras resultando en eutanasia. Tanto en los casos que se administró terapia de rescate como en los que solo se mejoró el tratamiento paliativo, se aumentó la analgesia y las combinaciones usadas incluían tramadol 4-8 mg/kg 2-3 veces al día, AINE a dosis estándar cada 24 h y comprimidos de paracetamol 500 mg/codeína 30mg dosificándose a través del componente de codeína de los comprimidos (1-2 mg/kg/12 h). En tres casos se administraron corticoides en combinación con la terapia analgésica.

El resumen de los tratamientos de rescate y analgésicos realizados, así como la posible causa de la muerte de los pacientes tratados con fosfato de toceranib y carprofeno se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Tratamientos de rescate y causa de la muerte de las perras del estudio.

Caso	Tratamiento de rescate	Tratamiento analgésico	Causa muerte/motivo
1	Doxorubicina IV (una sola dosis)	Tramadol+AINE+paracetamol/codeína	Eutanasia/Disminución calidad de vida
2	Doxorubicina IV (una sola dosis)	Tramadol+AINE	Eutanasia/Disminución calidad de vida
3	Ninguno	Tramadol+AINE+paracetamol/codeína	Eutanasia/Disminución calidad de vida
4	Ninguno	Tramadol+corticoides	Eutanasia/Disminución calidad de vida
5	Fallecida		Eutanasia/Disminución calidad de vida
6	Doxorubicina IV (una sola dosis)	Tramadol+AINE	Eutanasia/Disminución calidad de vida
7	Ninguno	Tramadol+corticoides	Eutanasia/Disminución calidad de vida
8	Doxorubicina IV (una sola dosis)	Tramadol+AINE	Fallece en casa/Disminución calidad de vida
9	Ninguno	Tramadol+AINE	Fallece en casa/Disminución calidad de vida
10	Ninguno	Tramadol+AINE+paracetamol/codeína	Eutanasia/Metástasis pulmonares
11	Ninguno	Tramadol+AINE+paracetamol/codeína	Eutanasia/Metástasis pulmonares
12	Ninguna	Tramadol+corticoides	Eutanasia/Metástasis pulmonares
13	Doxorubicina IV cada 3 semanas (2 dosis totales)	Tramadol+AINE	Eutanasia/Disminución calidad de vida
14	Ninguno	Tramadol+AINE	Eutanasia/Disminución calidad de vida
15	Ninguno	Tramadol+AINE	Eutanasia/Disminución calidad de vida

En ninguno de los casos se perdió el seguimiento del paciente. En aquellos casos que alguna de las visitas se hubiese realizado en el centro remitente de la perra, mediante llamada telefónica se recopilaron todos los datos de visitas sucesivas, incluyendo resultados de analíticas y la razón de la muerte o la eutanasia. En todos los casos la muerte se debió a enfermedad progresiva y los síntomas asociados principalmente a nivel local, apatía y anorexia pero además tres casos desarrollaron metástasis pulmonares. En trece perras se llevó a cabo la eutanasia mientras que dos perras fallecieron en casa después de rechazar la recomendación del clínico de realizar la eutanasia humanitaria debido al empeoramiento de su calidad de vida. Solo se realizó necropsia en uno de los perras detectando metástasis en ganglios linfáticos y pulmones.



Discusión

Tanto los tumores mamarios felinos como los carcinomas inflamatorios caninos (CIC) son probablemente los tipos de tumores mamarios con peor pronóstico descritos en ambas especies, siendo incurables en el caso de los CIC y en el caso de los tumores mamarios felinos, sólo la intervención quirúrgica en estadios tempranos se ha demostrado útil a la hora de alargar la supervivencia de estos pacientes aunque siguen siendo incurables en la mayoría de los casos. Es por tanto de vital importancia el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales que permitan mejorar su tratamiento (Marconato *et al.*, 2009; Clemente *et al.*, 2009; Morris 2013).

El trabajo aquí expuesto pretende evaluar el uso del fosfato de toceranib como nueva estrategia terapéutica, para el tratamiento de tumores mamarios en ambas especies. Así, los objetivos principales de este trabajo han sido determinar si la administración del fosfato de toceranib en el tratamiento de tumores mamarios en su presentación macroscópica, en gatos como monoterapia y en perros con CI en combinación con carprofeno, era eficaz y segura en animales donde los tratamientos previos hubieran fracasado y en aquellos casos en los que los propietarios hubiesen rechazado el tratamiento estándar. Ambos estudios clínicos se diseñaron prospectivamente siguiendo los criterios recientemente consensuados para el diseño de estudios clínicos en medicina veterinaria (Page *et al.*, 2016). Desde el punto de vista ético, el uso de mascotas en ensayos clínicos está aceptado y justificado debido a la similitud clínica y genética con los humanos, la falta de un modelo más apropiado para investigar nuevas terapias para medicina humana y la falta de tratamientos efectivos o estándar para tratar ciertas enfermedades en los perros y gatos, como ocurre por ejemplo con los tumores cerebrales, carcinoma inflamatorio y hemangiosarcoma entre otros (Kimmelman *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2014; Khanna *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2006; Paoloni *et al.*, 2008). El objetivo final de cualquier estudio clínico es mejorar el estándar de tratamiento pero desafortunadamente en medicina veterinaria, una proporción muy alta de los tratamientos estándar se basan en estudios retrospectivos. Estos estudios retrospectivos sólo deberían usarse para generar preguntas que pudiesen ser contestadas en ensayos prospectivos y rara vez se debería modificar el tratamiento convencional basándose en análisis retrospectivos (Vail 2007). La falta de tratamientos de elección en la mayoría de tipos de cáncer diagnosticados en medicina veterinaria, implica que se les puede ofrecer participar en ensayos clínicos como una opción terapéutica para sus mascotas antes de lo que ocurre en medicina humana (Burton *et al.*, 2014).

En medicina humana las directrices estándar para la realización de los ensayos clínicos y garantizar el bienestar de los pacientes están bien establecidas y además se revisan periódicamente (American Society of Clinical Oncology, 2003; Giuffrida *et al.*, 2104; Page *et al.*, 2016). La Unión Europea ha regulado recientemente mediante su directiva 2010/63/UE lo relativo a la experimentación con animales vivos, fomentando el uso de modelos alternativos de estudio o bien utilizando el menor número posible de animales y que eviten la muerte como punto final (Dir. 2010/63/Euratom del Consejo, de 20 de Octubre de 2010). El uso de primates no humanos, cuya semejanza genética los hace un modelo excelente para el estudio de multitud de patologías, se restringe al máximo por motivos éticos (Vail 2007, Burton *et al.*, 2014). Desafortunadamente no se ha desarrollado un consenso con pautas similares para los ensayos en animales de compañía. Así, aunque la normativa indica que si se usan perros o gatos, éstos deben recibir los cuidados, alojamiento y trato que respondan a sus características y necesidades individuales, no especifica cuales son (Dir. 2010/63/Euratom del Consejo, de 20 de Octubre de 2010). Debido a este vacío legal recientemente ha tenido lugar una reunión auspiciada por la American Veterinary Medical Association y los diferentes agentes involucrados en la realización, diseño y seguimiento de estudios clínicos en oncología veterinaria para tratar de determinar las Guías de Buena Conducta (GBC) en estudios realizados con animales de compañía (Page *et al.*, 2016). Uno de los principales objetivos de la reunión fue la creación de un consenso en torno a qué requisitos éticos del consentimiento informado utilizado en los ensayos clínicos en seres humanos podrían ser relevantes para los propietarios de animales de compañía incluidos en los ensayos clínicos veterinarios (Page *et al.*, 2016).

En medicina veterinaria los estudios fase II o los que tratan de evaluar actividad/eficacia de un fármaco o combinación de fármacos, tienden a ser estudios de un solo grupo en el que todos los pacientes inscritos reciben fármaco activo (es decir, no hay control de grupos y no se usan placebos). La inclusión de un grupo control sin tratamiento habría sido útil para la interpretación de algunos de los resultados obtenidos en este trabajo en relación al tiempo de supervivencia total, así como los tiempos de supervivencia libres de progresión. Sin embargo, incluir grupos donde no se facilita tratamiento alguno a los pacientes afectados de estas enfermedades tan agresivas se consideraría no ético (Vail 2007).

De manera similar, las perras y gatas que hubiesen recibido protocolos quimioterápicos previos no se incluyeron en nuestro trabajo como grupo control debido a que el objetivo del mismo no era comparar los resultados del fosfato de

toceranib con los de otros protocolos quimioterápicos, más aún cuando no existe un tratamiento de elección con el cual se pudiesen comparar.

Las terapias dirigidas como son los ITQ, representan un desafío en el diseño de los estudios clínicos, incluyendo la determinación de dosis óptimas y protocolo de administración, siendo necesario un conocimiento del mecanismo de acción de estos agentes a la hora de diseñar los estudios. En medicina humana el cambio de los estudios clínicos de agentes citotóxicos tradicionales a las nuevas terapias dirigidas también ha supuesto un reto importante ya que casi el 40% de los estudios clínicos en oncología humana investigan terapias dirigidas (Marconato *et al.*, 2015; Booth *et al.*, 2003; Vail 2007; Thamm *et al.*, 2015).

En los ensayos clínicos con agentes quimioterápicos tradicionales, la toxicidad se determina generalmente por el grado de mielosupresión y efectos secundarios gastrointestinales. Por el contrario, algunas terapias dirigidas no causan toxicidad significativa. En los estudios tradicionales la eficacia suele estar relacionada con la dosis: a mayor dosis, mayor posibilidad de toxicidad y consecuentemente mayor posibilidad de eficacia. Además, la evaluación de la eficacia de los agentes citotóxicos tradicionales suele ser a través de una reducción del volumen tumoral (Vail, 2007; Burton *et al.*, 2014), mientras que algunas terapias dirigidas como los ITQ y en concreto el fosfato de toceranib pueden conferir un beneficio clínico mediante la estabilización de los tumores inhibiendo su crecimiento y previniendo la formación de metástasis (Beeram *et al.*, 2002; Marconato *et al.*, 2015; Thamm *et al.*, 2015). Un reciente estudio donde se evaluaba mediante pruebas avanzadas de imagen la respuesta metabólica de diversos tumores tratados con fosfato de toceranib, demostró que algunos tumores a pesar de mantener su tamaño e incluso crecer según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015), presentaban una actividad tumoral metabólica muy reducida o inexistente sugiriendo que la reducción anatómica de los tumores suele tardar más que la respuesta metabólica y muerte celular (Leblanc *et al.*, 2012).

Esa es la principal razón por la que en nuestro estudio se incluyó el concepto de beneficio clínico, teniendo en cuenta no solo el efecto antitumoral del fármaco, si no también los efectos antiangiogénicos que suelen frenar el crecimiento del tumor incluyendo el mantenimiento de enfermedad estable dentro de la tasa de respuesta total (Eisenhauer *et al.*, 2000; Wahl *et al.*, 2009; Marconato *et al.*, 2015).. Normalmente se utiliza un período de tiempo clínicamente significativo, por lo general no menos de 6-8 semanas, con el fin de reflejar no sólo la progresión lenta

de la enfermedad si no un verdadero efecto de la nueva terapia (Thamm *et al.*, 2015, Marconato *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la evolución de la enfermedad sin tratamiento, se definió beneficio clínico en aquellos pacientes que eran capaces de mantener durante un tiempo prolongado, una respuesta completa, una respuesta parcial o una enfermedad estable según los criterios tradicionales RECIST (Nguyen *et al.*, 2015). Se consideró que la ausencia de progresión tumoral durante un mes en el caso de los CIC, donde los pacientes no suelen vivir más de un mes con o sin tratamiento era un tiempo razonable para definir beneficio clínico, mientras que en el caso de los tumores mamarios felinos con un curso de la enfermedad menos rápido se utilizó un tiempo de dos meses (Morris 2013, Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

Los dos parámetros utilizados para evaluar la supervivencia en nuestros estudios fueron el tiempo de supervivencia global y la supervivencia mediana libre de progresión. El tiempo de supervivencia suele considerarse el parámetro de elección para determinar eficacia de nuevos fármacos en medicina humana, sin embargo, este parámetro puede requerir una cantidad excesiva de tiempo para ser significativo y puede verse afectado por las decisiones de eutanasiar o buscar terapias alternativas o de rescate en nuestros pacientes (Vail 2007; Burton *et al.*, 2012; Thamm *et al.*, 2015). Es por eso que en ambos estudios no solo se utilizó este parámetro si no también la supervivencia mediana libre de progresión más útil en estudios clínicos de tumores sólidos donde no conseguimos una cura o donde se utilizan agentes teledirigidos como los ITQ, en nuestro caso el fosfato de toceranib (Korn *et al.*, 2013).

En medicina humana tanto los tumores de mama considerados “triple negativo” similares a los tumores mamarios felinos, como los CI, la quimioterapia citotóxica basada en taxanos y antraciclinas suponen el tratamiento estándar en el tratamiento neoadyuvante, adyuvantes o en enfermedad metastásica, aumentando la supervivencia aunque no consiga la curación en la mayoría de los casos (Dawood *et al.*, 2008; Twelves *et al.*, 2016).

Es por eso que en los últimos años el enfoque terapéutico ha cambiado centrándose en nuevas terapias, y en particular la inhibición de VEGF y la angiogénesis, proceso fundamental en la carcinogénesis y comportamiento biológico agresivo de estos tumores (Ferrara *et al.*, 2005). En medicina humana la adición en los últimos años de diversas terapias encaminadas a inhibir el VEGF y la angiogénesis en este tipo de tumores ha proporcionado mejoras en los tiempos

libres de enfermedad pero raramente aumentos en la supervivencia global de ambas enfermedades (Vasudev *et al.*, 2014).

Al igual que ocurre en los CIH, que presentan una agresividad superior al resto de tumores, en medicina veterinaria el tratamiento de los CIC se considera meramente paliativo, razón por la que se añadió como objetivo de este estudio el valorar la calidad de vida de los pacientes con este tipo de enfermedad con formularios de calidad de vida algo no descrito hasta la fecha en esta enfermedad en medicina veterinaria ni habitualmente utilizado en medicina humana para esta enfermedad (Robertson *et al.*, 2010).

El fosfato toceranib ha demostrado su eficacia en numerosos tumores caninos (Bavcar *et al.*, 2012), sin embargo hasta hace un año existía una escasez de estudios en la literatura veterinaria relativos al uso de este fármaco en gatos, siendo las dosis utilizadas extrapoladas principalmente de los estudios en perros (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016). Nuestro estudio representa uno de los pocos estudios prospectivos evaluando el fosfato de toceranib en pacientes felinos con enfermedad macroscópica. Uno de los tipos tumorales evaluados en otros estudios es el carcinoma de células escamosas donde se demostró una respuesta biológica al fosfato del toceranib del 56% (Wiles *et al.*, 2016). En otros estudios, los únicos casos que obtuvieron respuestas parciales o completas al fosfato de toceranib fueron los gatos con mastocitomas (Harper *et al.*, 2016). Sin embargo en otro tipo tumoral como los sarcomas asociados al punto de inyección no se observó ninguna respuesta (Holtermann *et al.*, 2016).

La edad media de 10.6 años de las gatas que participaron en nuestro estudio es similar a la descrita en la literatura existente (Borrego *et al.*, 2009; McNeill *et al.*, 2009). A pesar del relativamente pequeño número de pacientes en el estudio, los gatos siameses estuvieron sobrerrepresentados como ya ha sido descrito con anterioridad (Sorenmo *et al.*, 2013; Morris 2013). La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio eran gatas intactas o esterilizadas de forma tardía como suele ser habitual en la literatura veterinaria (Sorenmo *et al.*, 2013; Borrego *et al.*, 2009, McNeill *et al.*, 2009), lo que sugiere de forma indirecta que la esterilización temprana reduce el riesgo de desarrollar un tumor de mama en gatos como ya se ha descrito con anterioridad (Overley *et al.*, 2005). Además, ninguno de los pacientes había recibido tratamientos hormonales previamente, práctica que ha caído en desuso en los últimos años debido a la relación ya descrita entre el uso de estos fármacos con

un aumento en la aparición de tumores mamarios malignos (Jacobs *et al.*, 2010; Keskin *et al.*, 2009).

Las características de la presentación inicial de las gatas en el estudio fueron similares a las descritas en los estudios con tumores mamarios felinos con enfermedad macroscópica (Jeglum *et al.*, 1985; Mauldin *et al.*, 1988; Stolwijk *et al.*, 1989). Todos los propietarios que aceptaron participar en el estudio habían rechazado previamente el tratamiento de elección (cirugía) por diferentes motivos que incluían: miedo a otra recidiva, miedo a la anestesia, o la impresión de que administrar terapias teledirigidas como el fosfato de toceranib podía ser una opción menos invasiva.

En general las gatas incluidas en el estudio presentaban tumores avanzados. Cuatro de las gatas habían recibido tratamientos previos con quimioterapia, un 23% de nuestras gatas presentaban recidivas locales de cirugías previas y algunos casos se presentaron con enfermedad metastásica. Un 46% de los pacientes con tumores “de novo” habían sido operados previamente mediante mastectomías unilaterales o parciales desarrollando tumores en las mamas restantes en la cadena ipsilateral o contralateral. Es ya conocido que el drenaje linfático de las mamas en las gatas es diferente a las perras, pudiendo establecerse conexiones entre todas las mamas de una misma cadena e incluso cruzando cadenas mamarias (Papadopoulo *et al.*, 2009). Este tipo de drenaje, junto con la evidencia en la literatura que cirugías más extensas prolongan el tiempo libre de enfermedad (Novosad *et al.*, 2006), hace que se recomiende la resección de al menos una cadena mamaria (Morris 2013). Los seis casos de nuestro estudio que presentaron tumores “de novo” después de una historia de resección de tumores mamarios previa, pueden representar realmente tumores que no estén relacionados entre sí, pero es también muy plausible que se tratasen de metástasis/diseminación de los anteriores. Este tipo de casos donde aparecen tumores en las mamas contralaterales hacen que la recomendación de nuestro grupo y muchos otros siga siendo realizar al menos una mastectomía unilateral y si es factible una bilateral manteniendo siempre los criterios de cirugía oncológica reseccionando al menos 2 cm en la periferia y un plano de fascia en profundidad (Morris 2013; Sorenmo *et al.*, 2012).

Algunos autores sugieren una mayor incidencia de tumores en las mamas caudales (Morris 2013) así como una tasa alta de pacientes con varios tumores al diagnóstico (Hayes *et al.*, 1985), sin embargo la distribución de los tumores en nuestro estudio fue similar entre mamas caudales y craneales con solo 2 pacientes

presentando múltiples tumores al diagnóstico. El tamaño de los tumores en gatas es un factor pronóstico siendo el tamaño medio en nuestro estudio (2.95 cm) superior al de otros estudios (Borrego *et al.*, 2009; McNeill *et al.*, 2009; Novosad *et al.*, 2006) con un 41% de los pacientes pasando de los 3 cm, tamaño asociado a un peor pronóstico en diversos estudios (Zapulli *et al.*, 2015; Morris 2013; Viste *et al.*, 2002). Este hallazgo en nuestra población es probablemente debido a lo avanzado de la enfermedad en muchos casos y la negativa a realizar una cirugía por parte de los dueños. La ulceración también se ha asociado a un peor pronóstico, siendo el porcentaje de pacientes con ulceración de nuestro estudio (23%) similar a la literatura existente (Zapulli *et al.*, 2015).

Al igual que ocurre en tumores de mama en humana donde la citología es un método muy fiable para llegar al diagnóstico (77-99%) las PAF son más fiables en pacientes felinos que en perros con tumores mamarios ya que la mayoría son malignos y el grado de concordancia de citología e histopatología se ha descrito en hasta el 100% (Shafiee *et al.*, 2013). Es por lo que se aceptó como método diagnóstico en seis casos (35%) en este estudio facilitando la inclusión de pacientes con recidivas donde los dueños no estaban dispuestos a realizar nuevas anestесias o intervenciones quirúrgicas para obtener el diagnóstico. Los criterios citológicos descritos más frecuentemente en nuestras muestras fueron similares a los ya reportados en otro estudio (Shafiee *et al.*, 2013).

Las tres gatas (17%) que presentaron metástasis en el momento del diagnóstico fueron ganglionares, diagnosticadas mediante punción con aguja fina y citología. La frecuencia de metástasis ganglionares regionales raramente se ha evaluado en los estudios publicados hasta la fecha (Sorenmo *et al.*, 2013), con valores por encima del 25% (Morris 2013; De campos *et al.*, 2015). En aquellas publicaciones donde se describe la localización, dichas metástasis afectan principalmente a ganglios axilares e inguinales aunque el ganglio linfático esternal también puede estar afectado en hasta el 30% de los gatos como ocurrió en uno de los casos de nuestro estudio (5.8%) (Morris 2013). En nuestro estudio solo se investigaron los ganglios locoregionales si estaban aumentados de tamaño en el examen físico, por lo que la tasa de metástasis puede estar infrarrepresentada pudiendo ser mayor si se hubiese realizado de rutina en todos los ganglios palpables. Además un reciente estudio determina que hasta en un 22% de carcinomas la citología ganglionar puede no detectar metástasis que sí resultan evidentes en los estudios histopatológicos (Ku *et al.*, 2015).

La mayoría de los tumores analizados en nuestro estudio fueron de alto grado como es de esperar en esta especie y como ha sido descrito en otros estudios (Mills *et al.*, 2015; Hughes *et al.*, 2012). Existen varios sistemas para graduar los tumores caninos y felinos, la mayoría de los cuales se basan en el sistema de clasificación Elston y Ellis (Mills *et al.*, 2015) que incorpora información con respecto a la formación de túbulos, pleomorfismo nuclear, y las mitosis por cada 10 campos de inmersión. Dicha metodología también fue utilizada en nuestro estudio por los distintos patólogos que evaluaron las muestras. Aunque la mayoría de los autores atribuyen un valor pronóstico al grado histológico así como una asociación con el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad (Mills *et al.*, 2015; Seixas *et al.*, 2011; Millanta *et al.*, 2002, 2006; Castagnaro *et al.*, 1998), es difícil de definir qué metodología utiliza cada laboratorio de rutina.

La tasa de respuesta de los pacientes de este estudio siguiendo criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015) fue del 35.2% y un beneficio clínico en el 64.7% de las gatas, lo que apoya nuestra hipótesis de que el fosfato de toceranib tenga un potencial prometedor en el tratamiento de los tumores mamarios felinos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son comparables con los descritos tras la utilización de quimioterapia tradicional donde las tasas de respuesta varían entre el 26.6 y el 50% (Jeglum *et al.*, 1985; Mauldin *et al.* 1988; Stolwijk *et al.* 1989; Escriche *et al.*, 2016). Estos resultados de eficacia biológica en tumores mamarios son similares a los obtenidos en otros estudios con el mismo fármaco en tumores mamarios caninos que presentaban enfermedad avanzada en el mismo escenario clínico de enfermedad macroscópica (Gattino *et al.*, 2014). Varios de nuestros pacientes habían recibido tratamientos previos con quimioterapia tradicional pudiendo alterar la respuesta al fármaco. Hay estudios en humanos donde la respuesta del fármaco sunitinib es peor en los pacientes que han recibido varios tratamientos de rescate antes de comenzar con el fármaco (Bachelot *et al.*, 2014). Por otro lado, el sunitinib, fármaco casi idéntico en su estructura al fosfato de toceranib, y utilizado como monoterapia en tumores de mama agresivos triple negativo ha demostrado en varios estudios tasas de respuesta que oscilan entre un 3 y un 55% sin que los metaanálisis hayan observado un aumento de la supervivencia como monoterapia o en combinación comparado con los tratamientos quimioterápicos convencionales (Sun *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014).

Las respuestas individuales observadas en nuestro estudio tras el tratamiento con fosfato de toceranib podrían deberse a las propiedades antiangiogénicas o a las antitumorales del fármaco o incluso a una combinación de ambos efectos (London

2014). Modelos xenoinjertos murinos de tumores de mama humanos parecen sugerir el efecto proapoptótico como principal mecanismo de la muerte celular inducida por el fármaco (Theze *et al.*, 2015) y causante de las respuestas observadas. Sin embargo el tipo de muerte celular no se evaluó en las gatas de nuestro estudio. El estudio de la modulación de la diana por este tipo de fármacos (sunitinib, fosfato de toceranib) no suele realizarse de forma habitual en medicina humana ni veterinaria, por lo que no es posible concluir cuál o cuales han sido los mecanismos responsables que han producido la respuesta clínica en cada uno de los pacientes de este estudio.

El fosfato de toceranib inhibe entre otras dianas los receptores VEGF, PDGF y Kit. Hasta la fecha solo se conocía la expresión de una de estas dianas en tumores mamarios felinos: VEGF. Otra de las vías por la que se pudo producir el efecto antitumoral consistiría en la inhibición de Kit, receptor que se ha descrito su expresión en tumores mamarios felinos muy recientemente (Daughter *et al.*, 2016). Aunque no era uno de los objetivos del estudio la determinación de la presencia de estos receptores o los factores de crecimiento mediante el análisis inmunohistoquímico podría haber ayudado a la hora de determinar su papel en las respuestas observadas en el estudio.

Curiosamente uno de los pacientes de nuestro estudio, que obtuvo una respuesta parcial en su tumor primario progresó a distancia desarrollando derrame pleural maligno. Esta gata era una de las 4 que presentaba ulceración de su tumor siendo una de las 3 (75%) que presentó una respuesta parcial del tumor con mejoría de la ulceración (**Figura 3**). Esto sugiere que los pacientes con úlceras tumorales, como ya se ha descrito en humana con el uso de sunitinib (Sun *et al.*, 2016), parecen beneficiarse del uso de fosfato de toceranib. Sin embargo, se desconocen por ahora los mecanismos de acción implicados en dicho proceso.

La progresión de enfermedad metastásica ocurriendo de forma paralela a la respuesta del tumor primario observada en una de las gatas es algo descrito en medicina humana con el uso de ITQ donde pueden haber respuestas de tumores locales sin observarse una reducción de las lesiones metastásicas y en algunos casos incluso presentando enfermedad progresiva. Los tumores de mama no son los únicos tumores en los que puede ocurrir este fenómeno, habiéndose descrito varios casos donde las lesiones primarias y metastásicas no responden de manera igual al sunitinib (Jafri *et al.*, 2009) proponiéndose como posible causa una distribución del sunitinib no uniforme en los diferentes órganos del cuerpo, algo difícil

de comprobar en nuestros pacientes debido a que no existen los estudios farmacológicos/farmacodinámicos con el fosfato de toceranib en esta especie.

Otras de las posibles explicaciones para esta diferencia en la sensibilidad al fármaco podrían encontrarse en trabajos preclínicos en medicina humana que sugieren que la inhibición farmacológica de la angiogénesis y en particular el sunitinib podría acelerar el crecimiento de las metástasis después de la resección del tumor primario (Welti *et al.*, 2012; Ebos *et al.*, 2014). Las metástasis también pueden presentar resistencias al sunitinib debido a mecanismos que implican la formación de los vasos tumorales, vías de señalización angiogénicas, relación de tumor con el estroma y otros mecanismos poco conocidos (Vasudev *et al.*, 2014; Ebos *et al.*, 2014). Además, varios estudios han descrito las diferencias en el fenotipo molecular de metástasis de ganglios linfáticos en comparación con el fenotipo del tumor mamario primario (Beha *et al.*, 2012; Brunetti *et al.*, 2013) pero todavía no se dispone de datos sobre los fenotipos moleculares de metástasis a distancia y su correlación con el tumor mamario primario y su metástasis linfática asociada. En el caso de los tumores primarios y sus ganglios locoregionales metastásicos un estudio describió hasta un 42,9% de discordancia fenotípica (Brunetti *et al.*, 2013) por lo que no sería de extrañar que el fenotipo entre el tumor primario y las lesiones metastásicas lejanas en pulmón/pleura fuesen lo suficientemente diferentes para presentar diferentes tasas de respuesta a fármacos como los ITQ (Crusz *et al.*, 2016). Además sabemos que el uso de fármacos antiangiogénicos puede acelerar la selección y sobrecrecimiento de subpoblaciones tumorales resistentes al tratamiento utilizado activando vías de factores proangiogénicos alternos que explicase nuestro caso (Vasudev *et al.*, 2014). Es difícil evaluar cual o cuales de estos factores podría haber afectado en la falta de respuesta o control de la enfermedad al tratamiento de fosfato de toceranib en la metástasis pleural en esta gata.

La supervivencia mediana libre de progresión de la enfermedad de 91 días en gatas es muy similar al único otro estudio publicado donde se evalúa este parámetro (Escriche *et al.*, 2016). La mediana de supervivencia global fue de 145 días comparable a otros estudios (Jeglum *et al.*, 1985; Mauldin *et al.*, 1988; Stolwijk *et al.*, 1989, Escriche *et al.*, 2016).

La dosis y frecuencia de administración del fosfato de toceranib utilizada en el grupo de gatas se decidieron siguiendo las recomendaciones del prospecto. No hay estudios en medicina veterinaria que investiguen la farmacocinética y la

farmacodinámica del fosfato de toceranib administrado en gatos. Una de las limitaciones es que no se midieron niveles de fármaco en la sangre de las gatas tratadas en este estudio por lo que no se pudo determinar si se alcanzaron niveles suficientes en todos los casos para inhibir el receptor.

Aun así a diferencia de algunos de los otros estudios (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016) solo dos de las gatas fueron tratadas con 2.3 mg/kg siendo esta una dosis algo inferior a 2.4 mg/kg, dosis mínima administrada en perros para alcanzar los niveles en sangre de fármaco requeridos para la inhibición del RTQ (Bernabé *et al.*, 2013), asumiendo que en gatos la farmacodinámica/farmacocinética fuese similar que en perros. Una de las dos gatas consiguió una respuesta parcial y la otra una enfermedad estable por lo que de manera indirecta se puede inferir que la dosis utilizada fue la suficiente para inhibir los receptores en estos dos casos.

En tres casos se tuvo que reformular el fármaco. La reformulación en el campo de la oncología veterinaria es cada vez más frecuente ya que los agentes de quimioterapia de uso común en perros y gatos son fabricados para su uso en pacientes humanos y con frecuencia están formulados en tamaños de cápsulas/tabletas que son demasiado grandes para perros y gatos. Los fármacos citotóxicos no se pueden partir, tanto por razones de seguridad como por la distribución desigual de la sustancia activa dentro de la pastilla (Plumbs 2011). En nuestro caso la presentación de los comprimidos de fosfato de toceranib comercializado inicialmente para perros presenta un problema en aquellas gatas de menos de 3 kg y más de 6.6 kg donde los comprimidos de 10 y 15 mg no permiten la dosificación normalmente administrada de 2.4-3.25 mg/kg. Una preocupación ampliamente compartida es que la potencia y la estabilidad de estos fármacos reformulados no sea la misma que la aprobada por los organismos regulatorios de cada país (Robat *et al.*, 2016; Gargiulo *et al.*, 2013, Burton *et al.*, 2016). Además recientes estudios han demostrado que la potencia de cápsulas reformuladas de fármacos ampliamente utilizados en oncología veterinaria como son la ciclofosfamida y la lomustina en un porcentaje muy amplio de casos esta fuera del margen del 10% de variabilidad normalmente utilizado por los organismos regulatorios internacionales como la FDA (Burton *et al.*, 2016; Robat *et al.*, 2016). A pesar de que solo se necesitó reformulación en tres casos desconocemos si la potencia y estabilidad del fármaco era la adecuada para esas tres gatas aunque dado que una de ellas obtuvo una respuesta parcial se puede inferir que al menos en ese caso la potencia era la adecuada.

El perfil de toxicidad del fosfato de toceranib es relativamente bien conocido en las perras siendo los efectos adversos que se aprecian con mayor frecuencia los gastrointestinales (anorexia, vómitos, diarrea) y mielosupresión (Bernabé *et al.*, 2013; London *et al.*, 2009). Recientemente cuatro estudios han evaluado la tolerabilidad y eficacia del fosfato de toceranib como monoterapia o en combinación en gatos con cáncer (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016). Estos estudios en su mayor parte han evaluado la tolerabilidad en estudios con diseño retrospectivo.

En nuestros pacientes felinos, el protocolo fue bien tolerado, y no hubo interrupciones del tratamiento. Esto está de acuerdo con los artículos recientes en los que el fosfato de toceranib ha mostrado un buen perfil de seguridad en gatos (Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016). Los efectos adversos de nuestro estudio fueron generalmente leves de grado 1 y 2, y en un solo caso grado 3 manejado con una reducción de la frecuencia de administración. La mayoría fueron de tipo gastrointestinal (anorexia, vómitos), hematológico (neutropenia). Dos gatas desarrollaron elevaciones de ALT grado 2, coincidiendo con los artículos anteriormente mencionados donde parece que existe una mayor incidencia de hepatotoxicidad en gatos recibiendo fosfato de toceranib que en perros (Merrick *et al.*, 2016; Wiles *et al.*, 2016; Holtermann *et al.*, 2016; Olmsted *et al.*, 2016).

La administración del fosfato de toceranib en pacientes con tumores mamarios felinos macroscópicos se toleró bien y ha demostrado eficacia biológica. Sin sustituir al tratamiento de elección, que sigue siendo la cirugía, este tratamiento supone una opción más a discutir con dueños que rechacen esa posibilidad. La respuesta en el escenario macroscópico sugiere que este fármaco podría ser más eficaz en enfermedad residual mínima (microscópica) después de un tratamiento quirúrgico. A pesar de estos resultados, los estudios con quimioterapia adyuvante realizados hasta la fecha han obtenido resultados contradictorios a cerca de su papel prolongando la supervivencia (Borrego *et al.* 2009; McNeill *et al.*, 2009; Novosad *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2015, De campos *et al.*, 2014). Por ello son necesarios nuevos estudios prospectivos y randomizados para determinar los beneficios de los tratamientos adyuvantes en el tratamiento de los tumores mamarios felinos.

Al igual que en el apartado de tumores mamarios felinos, la edad media de las perras con CIC incluidas en el estudio fue muy similar a la literatura consultada, siendo en todos los casos perras geriátricas con una media de edad normalmente superior a los 10 años. Así mismo, diferentes estudios indican que las razas más grandes presentan una mayor incidencia de la enfermedad (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Marconato *et al.*, 2009). El peso medio de las perras de nuestro estudio fue superior a los 20 kg reafirmando esa aparente mayor incidencia en razas grandes.

Por otro lado, el único factor previamente descrito asociado con el pronóstico en perras con CI es la clasificación entre CIC primarios y secundarios, donde las perras que presentan un CIC primario parece que se asocian a un peor pronóstico que los que presentan un CIC secundario (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). La alta tasa de tumores primarios en nuestro estudio es similar a algunos de los estudios realizados con anterioridad en veterinaria y medicina humana donde es más frecuente el CIC primario comparado con el CIC secundario (Marconato *et al.*, 2009, Clemente *et al.*, 2009) aunque difiere de otras publicaciones (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2003) donde el CIC secundario es ligeramente más frecuente que el CIC primario. La presentación de CIC primario no se asoció a un peor pronóstico en nuestro estudio, siendo las supervivencias de ambos grupos casi idénticas. Tanto la distribución entre los dos tipos como la ausencia de diferencias significativas en las supervivencias pueden ser consecuencia del tamaño de la muestra en nuestro estudio que es pequeña en comparación con los estudios de otros autores (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

Casi la mitad de las perras (46.6%) estaban esterilizadas y ninguna había recibido tratamientos hormonales, a diferencia de otros estudios donde las perras no habían sido esterilizadas y se les había administrado tratamientos hormonales (Pérez-alenza *et al.*, 2001, Clemente *et al.*, 2009). Esto muy probablemente se deba a que cada vez es más frecuente la esterilización en nuestro país, reduciéndose el número de animales que potencialmente reciben tratamientos hormonales para inhibir el celo (Peña *et al.*, 2013). El estudio más reciente estudiando el CIC (Marconato *et al.*, 2009) parece corroborar esta tendencia donde más de un 70% de las perras estaban esterilizadas. La localización y el aspecto macroscópico de la lesiones fue similar a la descrita anteriormente en otros estudios siendo las mamas inguinales las más frecuentemente afectadas y en muchas ocasiones con afectación de varias mamas, además de la presencia de eritema, calor y firmeza de las mamas, un hallazgo común en todos los casos de nuestro estudio (Marconato *et al.*, 2009; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Otro de los hallazgos frecuentes en este tipo de

pacientes es la ausencia de masas medibles provocando que la mayor parte de los estudios no hayan utilizado criterios objetivos para evaluar la respuesta. Aquellos estudios donde sí se han valorado respuestas se han basado en criterios como la impresión subjetiva del clínico sobre la inflamación, grado de firmeza, percepción del grado de dolor (Souza *et al.*, 2009; Marconato *et al.*, 2009), siendo todas estas variables, subjetivas y sujetas a múltiples sesgos inherentes a no utilizar un sistema objetivo como pueda ser el sistema RECIST, aceptado tanto en medicina veterinaria como humana como el estándar para valorar las respuestas en tumores sólidos. Es por eso que la ausencia de masas medibles según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015) fue uno de los criterios de exclusión en nuestro estudio y la razón por la que se tuvo que excluir 3 animales al no tener lesiones medibles. Otros hallazgos frecuentes en el examen físico de nuestras perras incluyeron: linfedema de las extremidades posteriores, presencia de nódulos, linfadenopatía regional y ulceraciones, hallazgos ya descritos previamente en otros estudios (Marconato *et al.*, 2009; Pérez-Alenza *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2009).

Un reciente estudio describe un patrón metastásico diferente en los CIC, con metástasis más frecuentes en vejiga y resto de órganos reproductores comparado con las localizaciones observadas en carcinomas no inflamatorios (Clemente *et al.*, 2010). A diferencia de este estudio a ninguno de nuestros pacientes se le detectó una lesión metastásica en las citadas localizaciones, siendo las localizaciones más frecuentes los ganglios locoregionales e intrabdominales, resultados similares a lo descrito en otros estudios (Marconato *et al.*, 2009; Pérez-Alenza *et al.*, 2003). En un solo caso se detectó una lesión ósea metastásica en la porción diafisaria de la tibia diagnosticada mediante PAF y citología. Las metástasis óseas a pesar de no haberse descrito con frecuencia en los CIC, son relativamente habituales en los carcinomas inflamatorios humanos (Yang *et al.*, 2008).

En todos los casos donde se realizó la biopsia en cuña/elipse se detectaron complicaciones mientras que la realización de la biopsia mediante “punch” sólo presentó complicaciones en un paciente (8.3%) lo que sugiere que esta última técnica de adquisición de muestras es más segura en este tipo de pacientes. Esto coincide que lo observado en el estudio de Clemente y Colaboradores donde no se describieron complicaciones mayores realizando biopsias tipo “punch” (Clemente *et al.*, 2009). Una paciente sufrió una hemorragia grave durante la toma de biopsia incisional en cuña requiriendo la administración de hemoderivados y hospitalización posterior. Dicha complicación pudo estar influenciada por alteraciones en la coagulación previamente descritas en tumores mamarios siendo más frecuentes en

los pacientes con CIC (21%) o metástasis (Stockhous *et al.*, 1999; Marconato *et al.*, 2009) sin haberse podido determinar el mecanismo subyacente.

En nuestro estudio, al igual que en la mayoría de los trabajos publicados no se evaluó de forma rutinaria los perfiles de coagulación (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009). A pesar de que estas alteraciones de la coagulación son infrecuentes (Marconato *et al.*, 2009), y que muchas veces el diagnóstico de la enfermedad es clínico y no requiere biopsias, el hecho de que se haya asociado a un peor pronóstico al menos en un estudio en CIC y casos como el de nuestro estudio con sangrados graves, hacen recomendable realizar perfiles de coagulación en aquellos casos que se plantee realizar una biopsia.

Un alto porcentaje (73%) de casos se presentó con leucocitosis en el momento del diagnóstico inicial, probablemente debido a la inflamación de la zona, y que ha sido referido también en un estudio de Clemente y Colaboradores que describe los hallazgos analíticos antes de comenzar el tratamiento de estos pacientes (Clemente *et al.*, 2009). Destacar que al mes de iniciar el tratamiento en 5 de 11 casos (45%) la leucocitosis desapareció volviendo a valores normales.

Respecto al tratamiento, y al igual que en anteriores estudios con quimioterapia tradicional (Clemente *et al.*, 2009; Marconato *et al.*, 2009), ninguno de los pacientes respondió al tratamiento con fosfato de toceranib, aunque nuestro estudio es el único que sigue los criterios RECIST para evaluar respuesta de forma objetiva. Suponiendo que la probabilidad de una remisión espontánea es menor al 5% y esperando una tasa de respuesta al menos del 25% para que se pueda considerar la combinación como eficaz (Simon *et al.*, 1989), con una $p=0.05$ y una potencia de 0,8 llegamos a la finalización del ensayo después de 15 casos y sin respuestas.

En la actualidad el criterio de valoración de respuesta utilizado con más frecuencia en medicina humana y veterinaria para los tumores sólidos es el cambio en el tamaño del tumor evaluados mediante el sistema RECIST. Sin embargo igual que ocurre en humana, debido a que la mayoría de los pacientes con CIC no tienen una masa medible sino más bien un tumor infiltrante difuso, la medición de la extensión de la enfermedad y el seguimiento con los métodos convencionales es difícil en esta enfermedad. Además en medicina humana se ha sugerido que el tamaño del tumor no tiene el mismo valor pronóstico que en pacientes con carcinoma de mama no inflamatorio (Robertson *et al.*, 2010). Debido estas

limitaciones del sistema RECIST en este tipo de tumor en particular y en estudios que incluyen fármacos antiangiogénicos (Vail 2007; Marconato *et al.*, 2015), uno de los criterios de inclusión del estudio era la posibilidad de medir el tumor siguiendo estos criterios combinado una evaluación de la calidad de vida mediante cuestionarios para así evaluar la eficacia biológica.

A pesar de no obtener respuestas según criterios RECIST si que se observó una tasa más alta de enfermedades estables (64%) comparado con un 5% en el artículo con mayor número de pacientes (Marconato *et al.*, 2009). Los estudios realizados con anterioridad han descrito que los pacientes con esta enfermedad no suelen vivir más de 30-60 días desde que se realiza el diagnóstico (Clemente *et al.*, 2009, Pérez-Alenza *et al.*, 2003; Marconato *et al.*, 2009). La comparación con estudios anteriores presenta muchas limitaciones como que presentan diferentes diseños, el hecho de que se hayan realizado en diferentes países, diferentes tipos de tratamientos, la evolución de las técnicas diagnósticas con el paso de los años, algunos no son controlados, etc. Aún así la tasa de enfermedad estable de un 64% utilizando criterios objetivos (RECIST) es muy superior a las descritas en los estudios realizados hasta la fecha.

El tratamiento médico de los perros con cáncer diseminado es en gran medida paliativo y el CI es un claro ejemplo debido a su agresividad dado que el principal motivo de eutanasia en pacientes con este tipo de patología es el deterioro del animal debidos a la rápida progresión de la enfermedad (dolor, anorexia, apatía) (Marconato *et al.*, 2009; Clemente *et al.*, 2009; Pérez-Alenza *et al.*, 2003). Otros estudios describen el uso de tratamientos paliativos incluyendo la administración de AINEs, analgésicos o antiinflamatorios esteroideos (Souza *et al.*, 2009; Clemente *et al.*, 2009; Marconato *et al.*, 2009). El beneficio de la administración de este tipo de tratamientos paliativos incluyendo la administración de AINEs es probablemente debido a la paliación de los signos provocados por el tumor, principalmente el dolor. Pero el efecto beneficioso se cree que no solo reside en este efecto analgésico del fármaco, si no la inhibición de COX-2 como un posible mecanismo antitumoral ya que es un componente esencial de la carcinogénesis en los CIC y CIH induciéndose en respuesta a estímulos inflamatorios (Clemente *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2014). Además los CIC presentan sobreexpresión de esta enzima y los tratamientos que incluyen fármacos anti-COX2 parecen aumentar la supervivencia (Clemente *et al.*, 2009, 2013). En otro estudio en siete de siete perras (100%) recibiendo piroxicam, AINE no selectivo COX-1/COX-2 como único agente en CIC el veterinario

responsable describió disminución de eritema, edema, y dolor, así como mejoría en su movilidad y apetito (Souza *et al.*, 2009).

En nuestro estudio se eligió el carprofeno que inhibe selectivamente la síntesis de prostaglandinas inducida por la COX-2 y no lleva a la alta incidencia de efectos gastrointestinales y renales que se pueden observar cuando se inhibe la actividad de la COX-1 (Flory *et al.*, 2005, Mansa *et al.*, 2007).

La toma de decisiones en cuanto al tipo y duración del tratamiento a menudo requiere que el clínico y el propietario evalúen la calidad de vida del paciente. Esta evaluación se basa típicamente en la inferencia y la suposición, que puede o no, ser un fiel reflejo de la condición del paciente. Es por eso que es importante tener una herramienta objetiva y precisa para evaluar de forma eficaz la calidad de vida del animal de compañía recibiendo tratamientos anticancerígenos (Giuffrida *et al.*, 2014). Este punto es además de especial importancia en el caso de un estudio clínico donde los perros son tratados con el consentimiento informado de los dueños, buscando una opción de tratamiento, e intentando una mejora de la calidad de vida del animal a la vez que contribuyen a la investigación (Vail 2007). Es por ello que el diseño de nuestro ensayo clínico trató de preservar el bienestar del paciente así como proporcionar tratamiento de soporte, el alivio del dolor y otros signos clínicos además de valorar la calidad de vida.

Son varios los grupos que han intentado incluir mediciones objetivas de calidad de vida (Bowles *et al.*, 2010; Crawford *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2011; Iliopoulo *et al.*, 2013; Mellanby *et al.*, 2003) pero no existe ninguna herramienta integral que evalúe la calidad de vida de manera objetiva en un entorno de la oncología clínica veterinaria (Giuffrida *et al.*, 2014). En nuestro caso se utilizó el **“Formulario del tratamiento del cáncer”** descrito por Lynch y Colaboradores (Lynch *et al.*, 2011) y que ha sido utilizado en otros estudios clínicos posteriores en oncología veterinaria y en particular en combinaciones de fosfato de toceranib con AINE y otros fármacos de quimioterapia tradicional (Chon *et al.*, 2012; Robat *et al.*, 2012). El único estudio que describe mejoría clínica de perras con CI no utilizó un cuestionario y se basó en la percepción subjetiva del veterinario clínico responsable sobre la evolución de los pacientes (Souza *et al.*, 2009).

De acuerdo con las respuestas a los formularios de calidad de vida se pudo observar una mejoría en la calidad de vida de los pacientes siguiendo la escala de evaluación visual (EEV) del cuestionario. En particular, y sobre la base de la evaluación del propietario, las categorías donde hubo una mejoría significativa entre

el diagnóstico y los 30 días de tratamiento fueron: felicidad, estado mental, apetito y movilidad general. Sin embargo, el aumento de la movilidad también puede estar relacionado con los efectos del carprofeno en la osteoartritis, que se producen con frecuencia en las razas más grandes y la población geriátrica canina, en lugar de ser atribuido a un efecto antitumoral verdadero (Mansa *et al.*, 2007). Siendo esta una enfermedad incurable y difícil de valorar respuestas según criterios convencionales como RECIST, y donde seguimos sin encontrar un tratamiento eficaz, tal vez estos cuestionarios de calidad de vida puedan facilitar la toma de decisiones en el tratamiento y evaluación de pacientes con CIC (Ilioppoulo *et al.*, 2013).

Al igual que en el estudio de Souza y Colaboradores en nuestras perras el veterinario evaluando esos criterios subjetivos (dolor, eritema y firmeza de las lesiones) describió mejoría de al menos una variable en la mayoría de los animales a los 15 días (80%) y 30 días del inicio de tratamiento (66%) (Souza *et al.*, 2009).

Además de las respuestas medibles, la paliación de los síntomas asociados al tumor es un factor importante en la medicina veterinaria. Uno de los ejemplos es un estudio con masitinib, el otro ITQ comercializado en medicina veterinaria (Holtermann *et al.*, 2016) donde algunos pacientes con linfoma epiteliotrópico a pesar de progresar sus tumores según criterios RECIST, las lesiones cutáneas (erosiones y costras) así como el prurito mejoraban. Estos signos clínicos asociados con las lesiones de la piel son los más molestos para el paciente y puede incitar a los propietarios a considerar la eutanasia. Existen otros tumores asociados a reacciones inflamatorias en perros y gatos como son los carcinomas de cuello y boca, los adenocarcinomas nasales y el linfoma epiteliotrópico canino (London *et al.*, 2012; Bernabé *et al.*, 2013; Wiles *et al.*, 2016) que también responden a ITQ, asociándose esas respuestas a la inhibición de VEGFR, pero aún no se han dilucidado el mecanismo exacto de acción de los ITQ en neoplasias no influenciadas por mutaciones en KIT (London *et al.*, 2014). Por lo tanto, puede que los ITQ ejerzan su efecto a través de mecanismos aun desconocidos que se dirigen a tumores con componentes inflamatorios, tales como el CIC. En concreto en los CIC podría deberse a la actividad antiangiogénica y/o el bloqueo de vías VEGFD implicadas en la linfangiogenesis, vía sobreactivada en esta enfermedad (Vermuelen *et al.*, 2010; Raposo *et al.*, 2016; Clemente *et al.*, 2013), mejorando el flujo y edema de las extremidades algo que observamos en el 100% de los pacientes que se presentaron con linfedema de las extremidades en nuestro estudio.

Además de los efectos de los fármacos inhibidores de COX-2 reduciendo la tumorigénesis y la progresión tumoral, recientes estudios *in vitro* han demostrado que los inhibidores de COX-2 y los fármacos antiangiogénicos como sunitinib ejercen efectos antiangiogénicos aditivos contra el cáncer de mama lo que también puede haber influido en la mayor tasa de enfermedades estable y mejoría subjetiva del componente inflamatorio (Ben-Batalla *et al.*, 2015).

Siendo el CIC una enfermedad tan agresiva y que suele producir un deterioro significativo de la calidad de vida de los pacientes (Clemente *et al.*, 2009, Pérez-Alenza *et al.*, 2003; Marconato *et al.*, 2009), en nuestro estudio se consideró que para poder incluirse dentro del termino beneficio clínico los pacientes debían mantener la EE un mes junto con la percepción por parte de los dueños reflejada en los cuestionarios, que la calidad de vida de sus mascotas era mejor que antes de comenzar el tratamiento. Un 64% de los pacientes cumplieron estos criterios a los dos meses de tratamiento.

La supervivencia de nuestro estudio fue de 117 días, bastante superior a los estudios de Marconato y Colaboradores (35 días) o Pérez-Alenza y Colaboradores (25 días) pero inferior al grupo de Souza y Colaboradores con una supervivencia libre de progresión de casi 5 meses que es hasta la fecha el estudio con mejores resultados y donde los pacientes eran tratados solo con piroxicam (Pérez-alenza *et al.*, 2003; Marconato *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009). La diferencia en nuestro estudio comparado con el de Souza y Colaboradores es que seguíamos criterios RECIST para evaluar respuesta y nos apoyábamos en los cuestionarios de calidad de vida para definir el beneficio clínico. Además, estas diferencias pueden deberse no solo a los diferentes tratamientos empleados si no al bajo poder de estos estudios debido al bajo número de casos incluidos. Nuestros resultados se han comparado con la información histórica publicada en perros sometidos a quimioterapia o tratamientos paliativos que son muy poco homogéneos, de diseño retrospectivo y con escaso número de casos, lo que hace difícil poder extrapolar conclusiones sobre nuestros resultados.

La tasa de efectos secundarios en este estudio fue muy baja y manejable con tratamiento de soporte. Tal y como está descrito con tratamientos con fosfato de toceranib como monoterapia o en combinación con un AINE, las toxicidades más frecuentes que observamos consistieron principalmente en efectos secundarios gastrointestinales grado 1 y 2, incluyendo vómitos, diarrea y anorexia (Bernabé *et al.*, 2013; Chon *et al.*, 2012). Al igual que estudios recientes donde las dosis de

fosfato de toceranib oscilan entre 2.4-2.75 mg, ninguna de las perras tratadas presentaron efectos adversos grado 3/4 (Bernabé *et al.*, 2013; London *et al.*, 2012). Aunque la inhibición de VEGFR no se evaluó específicamente en este estudio, se ha demostrado que perros recibiendo toceranib a dosis entre 2.4 y 2.9 presentan un aumento de VEGF en plasma consistente con una inhibición de VEGFR2 (Bernabé *et al.*, 2013) encontrándose todas las perras de nuestro estudio en ese rango de dosis.

Muy probablemente la dosificación de tres días semanales (lunes, miércoles, viernes) y que el objetivo de la dosificación del fosfato de toceranib estaba entre 2.4-2.75 mg/kg, una dosis inferior a la del prospecto hayan influenciado en la baja tasa de efectos secundarios como ya han descrito otros autores (Bernabé *et al.*, 2013; Chon *et al.*, 2012; London *et al.*, 2014; Gardner *et al.*, 2015). A pesar de las dificultades inherentes en la comparación de los resultados de diversos estudios, la dosis de fosfato de toceranib utilizado en el presente estudio (2.56 mg/kg) fue mejor tolerada en comparación con la dosis del prospecto, lo que permite una mejor adherencia al protocolo de tratamiento.

En resumen, y a diferencia de los resultados obtenidos en gatas, el estudio realizado en perras con CI y tratadas con fosfato de toceranib y carprofeno no mostró ninguna eficacia clínica según criterios RECIST (Nguyen *et al.*, 2015). Sin embargo, se toleró muy bien y los efectos adversos fueron generalmente leves y se resolvieron con tratamiento de soporte. Además la calidad de vida de los pacientes mejoró en una mayoría de individuos junto con una mejoría clínica subjetiva.

A diferencia de los ensayos clínicos desarrollados en medicina humana, conseguir que los dueños de mascotas participen en estos estudios presenta problemas añadidos que incluyen múltiples visitas al hospital, adherencia de los dueños al estudio así como que en muchos casos se desconoce el espectro de toxicidad del fármaco, por lo que el papel del consentimiento informado es vital (Vail 2007; Burton *et al.*, 2015). En nuestro caso el coste de la administración del fosfato de toceranib fue facilitado por el estudio en el caso de los gatos facilitando la inclusión y adherencia de los pacientes por parte de los dueños. A pesar de los riesgos y las complicaciones en el reclutamiento inherentes a estos estudios, nuestro trabajo es un ejemplo del beneficio que pueden aportar a clientes cuyas mascotas no han respondido al tratamiento convencional o estándar como en el caso de las gatas, o bien si la mascota tiene un tipo de tumor para el que la respuesta a la terapia tradicional se considera mala como es el caso de las perras

con CI. Varios clientes mencionaron al incluir a su mascota en el estudio que deseaban ayudar a la ciencia a avanzar con la esperanza de ayudar a otros animales.

Este trabajo ha pretendido determinar eficacia biológica y tolerabilidad del fosfato de toceranib en tumores mamarios felinos y caninos, con un número de casos reducido. Por este motivo, los resultados obtenidos no nos permiten extrapolarlos a la población general para lo que necesitaríamos un número superior de casos. Sin embargo estos resultados sí que nos permiten determinar que en pacientes felinos el fosfato de toceranib presenta actividad antitumoral que debería ser investigada en otros estudios prospectivos con un mayor número de casos para determinar si la tasa de respuesta observada en nuestro grupo es extrapolable a la población general. Además las respuestas observadas en un escenario de enfermedad macroscópica sugiere que pueda ser más eficaz en enfermedad microscópica, para lo que serían necesarios estudios utilizando el fármaco de forma adyuvante a la cirugía.

En el caso del CIC, a pesar de que se observase beneficio clínico en un 64% de los pacientes, no se observaron respuestas objetivas según criterios RECIST. Estos resultados están en consonancia con el uso de monoterapias dirigidas a VEGFR en CIH que han resultado en beneficios muy modestos (Dawood *et al.*, 2008; Twelves *et al.*, 2016).

Uno de los problemas más frecuentes a la hora de utilizar estos fármacos teledirigidos en medicina humana y veterinaria es la necesidad de identificar y validar biomarcadores que puedan predecir la respuesta a dichos fármacos. El subtipado molecular ha identificado varias características específicas de los CIH en comparación con el cáncer de mama no inflamatorio y ha permitido la identificación de nuevas dianas terapéuticas para regular la naturaleza agresiva del CIH. Los CIH con mayor expresión de genes tumorales de VEGF-A, CD-31 y PDGFR- β fueron más propensos a beneficiarse del tratamiento con una terapia dirigida a VEGF como es el bevacizumab combinado con quimioterapia (Yang *et al.*, 2009). Se ha propuesto que VEGF-A podría ser utilizado para estratificar los pacientes de CIH en grupos de bajo riesgo y de alto riesgo de muerte y recaídas.

Una de las carencias de nuestro estudio ha sido el no haber evaluado la expresión de VEGF y utilizar dicho parámetro para la estratificación de los pacientes tanto en perras como gatas. Esto es algo que se ha propuesto en medicina humana para determinar la eficacia de este tipo de terapias encaminadas a inhibir VEGF

para determinar subgrupos de pacientes que se puedan beneficiar de estos tratamientos, pero revisando la literatura sigue siendo una carencia en todos los estudios de CIH consultados (Elgebaly *et al.*, 2016).

A pesar de los efectos sinérgicos observados de la combinación *in vitro* de la quimioterapia tradicional y los ITQ, estas combinaciones no son muy frecuentes en mujeres con tumores de mama (Wang *et al.*, 2014). Un enfoque aprovechando ambos modelos de oncología comparada que nos ofrecen los CIH y tumores mamarios felinos, que está estudiando nuestro grupo es la combinación del fosfato de toceranib junto con un quimioterápico ampliamente utilizado en tumores de mama como es la doxorubicina tanto en paciente caninos y felinos. La doxorubicina es uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados en medicina veterinaria y ha mostrado actividad contra una variedad de histologías. Este amplio espectro de actividad hace que la doxorubicina sea un agente atractivo para mejorar aún más la actividad antitumoral del fosfato de toceranib gracias a un efecto sinérgico observado ya en algunos estudios en medicina veterinaria y humana (Pellin *et al.*, 2016). Hemos comenzado un estudio en perros usando la dosis tolerada de 25 mg/m² de doxorubicina en combinación con el fosfato de toceranib y carprofeno evaluando su eficacia y tolerabilidad en perras con CIC además de un estudio fase I para la combinación de doxorubicina y el fosfato de toceranib en gatos con diversos tipos de neoplasias

El tratamiento del cáncer de mama en humana está basado cada vez más en el perfil molecular de los tumores y no sólo en la histología. Hay escasez de datos de ensayos a gran escala, prospectivos, multicéntricos y aleatorizados debido a la baja incidencia de cáncer de mama inflamatorio y los regímenes quimioterapéuticos óptimos, en combinación con tratamientos dirigidos, aún no se han definido. Los ensayos futuros para evaluar agentes específicos son necesarios para mejorar la supervivencia de los pacientes con esta forma agresiva de cáncer de mama. Los estudios en perras y gatas con estas patologías pueden ayudarnos al desarrollo traslacional de esta clase de combinaciones novedosas de agentes mediante la definición de toxicidad, actividad y relaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas tumorales que serían difíciles de responder en otros modelos preclínicos o en ensayos clínicos en seres humanos, poniendo de relieve el valor del modelo animal en enfermedades tan similares como son los tumores de mama en gatas y los CIC en perras comparados con sus homólogos en medicina humana.

En resumen, este trabajo de Tesis Doctoral supone el primer estudio en el que se ha descrito el uso del fosfato de toceranib como monoterapia en pacientes felinos con tumores mamarios o en combinación con AINEs en perros con carcinoma inflamatorio. Los hallazgos presentados en este trabajo abren nuevas líneas de investigación en este tipo de tumores mamarios tan agresivos, con la esperanza de que sirvan de ayuda para el futuro tratamiento de este tipo de cáncer tanto en medicina humana como veterinaria.



Conclusiones

1. Este trabajo en su conjunto describe por primera vez el uso de fosfato de toceranib como nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de tumores mamarios felinos y carcinomas inflamatorios caninos. El protocolo fue bien tolerado y los efectos adversos fueron generalmente leves resolviéndose con tratamiento de soporte.
2. La administración de fosfato de toceranib en gatas con tumores mamarios en su presentación macroscópica demostró eficacia biológica con una tasa de respuesta del 35.2% siguiendo criterios RECIST y un beneficio clínico en el 64% de los casos. Estos resultados son comparables con los descritos tras la utilización de quimioterapia tradicional y sugieren que este fármaco podría ser eficaz en enfermedad residual mínima después de un tratamiento quirúrgico.
3. A diferencia de en gatas, el tratamiento con fosfato de toceranib en combinación con carprofeno en perras no mostró eficacia biológica siguiendo criterios RECIST. No obstante, un 64% de los pacientes presentaron beneficio clínico a los dos meses de iniciar el protocolo entendiéndose como una mejoría en la calidad de vida y la no progresión de la enfermedad según criterios RECIST.
4. Además, en este trabajo se evalúa por primera vez la calidad de vida de perras con CIC a través de un cuestionario de calidad de vida publicado en veterinaria para su uso en pacientes con cáncer. Algunas de las categorías donde los dueños en al menos una de las preguntas percibieron mejoría y que fueron estadísticamente significativas incluyeron: felicidad, estado mental, apetito y movilidad general.



Bibliografía

1. Adams, V.J., Evans, K.M., Sampson, J., Wood, J.L.N., 2010, Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J Small Anim Pract* 51, 512-524.
2. Alleman, A.R., Bain, P.J., 2000, Diagnosing neoplasia: the cytological criteria for malignancy. *Vet Med* 95, 204-223.
3. Alvarez, C.E., 2014, Naturally Occurring Cancers in Dogs: Insights for Translational Genetics and Medicine. *ILAR Journal* 55, 16-45.
4. American society of clinical oncology policy statement: oversight of clinical research. 2003, *J Clin Oncol* 21, 2377–2386.
5. Angstadt, A.Y., Motsinger-Reif, A., Thomas, R., Kisseberth, W.C., Couto, G.C., Duval, D.L., Nielsen, D.M., Modiano, J.F., Breen, M., 2011, Characterization of canine osteosarcoma by array comparative genomic hybridization and RT-qPCR: Signatures of genomic imbalance in canine osteosarcoma parallel the human counterpart. *Genes Chromosome Cancer* 50, 859-874.
6. Angstadt, A.Y., Thayanithy, V., Subramanian, S., Modiano, J.F., Breen, M.A., 2012, A genome-wide approach to comparative oncology: high-resolution oligonucleotide aCGH of canine and human osteosarcoma pinpoints shared microaberrations. *Cancer Genetics* 205, 572-587.
7. Aragon, C.L., Hofmeister, E.H., Budsberg, S.C., 2007, Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 230, 514–521.
8. Araújo, M.R., Campos, L.C., Damasceno, K.A., Gamba, C.O., Ferreira, E., Cassali, G.D., 2016, HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Res Vet Sci* 106, 121-30.
9. Arenas, C., Peña, L., Granados-Soler, J.L., Pérez-Alenza, M.D., 2016, Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *Vet Rec* 179, 125.
10. Arias-Pulido, H., Chaher, N., Gong, Y., Qualls, C., Vargas, J., Royce, M., 2012, Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* 12, 298.
11. Bachelot, T., Garcia-Saenz, J.A., Verma, S., Gutierrez, M., Pivot, X., Kozloff, M.F., Prady, C., Huang, X., Khosravan, R., Wang, Z., Cesari, R., Tassell, V., Kern, K.A., Blay, J.Y., Lluch, A., 2014, Sunitinib in combination with

- trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study. *BMC Cancer* 14, 166.
12. Baraf, H.S., Fuentealba, C., Greenwald, M., Brzezicki, J., O'Brien, K., Soffer, B., Polis, A., Bird, S., Kaur, A., Curtis, S.P., EDGE Study Group., 2007, Gastrointestinal side effects of etoricoxib in patients with osteoarthritis: Results of the Etoricoxib versus Diclofenac Sodium Gastrointestinal Tolerability and Effectiveness (EDGE) trial. *J Rheumatol* 34, 408–420.
 13. Bavcar, S., Argyle, D.J., 2012, Receptor tyrosine kinase inhibitors: molecularly targeted drugs for veterinary cancer therapy. *Vet comp Oncol* 10, 163-73.
 14. Bearss, J.J., Schulman, F.Y., Carter, D., 2012, Histologic, Immunohistochemical, and Clinical Features of 27 Mammary Tumors in 18 Male Dogs. *Vet Pathol* 49, 602-7.
 15. Beauvais, W., Cardwell, J.M., Brodbelt, D.C., 2012, The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs—a systematic review. *J Small Anim Pract* 53, 314–322.
 16. Beeram, M., Patnaik, A., 2002, Targeting intracellular signal transduction. A new paradigm for a brave new world of molecularly targeted therapeutics. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 16, 1089–1100.
 17. Beha, G., Brunetti, B., Asproni, P., Muscatello, L.V., Millanta, F., Poli, A., Sarli, G., Benazzi, C., 2012, Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Vet Res* 8, 219.
 18. Ben-Batalla, I., Cubas-Cordova, M., Udonta, F., Wroblewski, M., Waizenegger, J.S., Janning, M., Sawall, S., Gensch, V., Zhao, L., Martinez-Zubiaurre, I., Riecken, K., Fehse, B., Pantel, K., Bokemeyer, C., Loges, S., 2015, Cyclooxygenase-2 blockade can improve efficacy of VEGF-targeting drugs. *Oncotarget* 6, 6341-58.
 19. Bentley, R.T., Ahmed, A.U., Yanke, A.B., Cohen-Gadol, A.A., Dey, M., 2016, Dogs are man's best friend: in sickness and in health. *Neuro Oncol* Jun 13. pii: now109. [Epub ahead of print].
 20. Bergman, P.J., Wolchok, J.D., 2008, Of mice and men (and dogs): Development of a xenogenic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy* 6, 817-826.
 21. Bernabe, L.F., Portela, R., Nguyen, S., Kisseberth, W.C., Pennell, M., Yancey, M.F., London, C.A., 2013, Evaluation of the adverse event profile and

- pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. *BMC Vet Res* 9, 190.
22. Bild, A.H., Yao, G., Chang, J.T., Wang, Q., Potti, A., Chasse, D., Joshi, M.B., Harpole, D., Lancaster, J.M., Berchuck, A., Olson, J.A., Marks, J.R., Dressman, H.K., West, M., Nevins, J.R., 2006, Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 439, 353-357.
 23. Biller, B., 2014, Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer: rethinking the targets and strategies of chemotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 44, 817-29.
 24. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L., 2004, Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
 25. Bonkobara, M., 2015, Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *Vet J* 205, 180-8.
 26. Booth, B., Glassman, R., Ma, P., 2003. Oncology's trials. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 609–610.
 27. Borrego, J.F., 2016, Urogenital and Mammary Gland Tumors, CHAPTER 351 Ettinger S.J., Feldman, E. 8th Edition. St Louis, Elsevier. 2119-2126.
 28. Borrego, J., 2016, Efficacy of toceranib phosphate plus carprofen for treatment of canine inflammatory mammary carcinoma. *Proceedings Annu Meet VCS*, 98.
 29. Borrego, J.F., Cartagena, J.C., Engel, J., 2009, Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Vet Comp Oncol* 7, 213-21.
 30. Borrego J., 2014, Prospective study of toceranib phosphate in feline mammary tumors. *Proceedings Annu Meet ESVONC*, 116.
 31. Borrego J., 2014 Toceranib phosphate, cyclophosphamide and prednisone as a rescue protocol in canine multicentric lymphoma. *Proceedings Annu Meet ESVONC*, 115.
 32. Borzacchiello, G., Paciello, O., Papparella, S., 2004, Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. *J Comp Pathol* 131, 70–76.
 33. Bostock, D.E., 1975, The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur J Cancer* 11, 389-396.

34. Bowles, D.B., Robson, M.C., Galloway, P.E., Walker, L., 2010, Owner's perception of carboplatin in conjunction with other palliative treatments for cancer therapy. *J Small Anim Pract* 51, 104-12.
35. Brunelle, M., Sartin, E.A., Wolfe, L.G., Sirois, J., Dore, M., 2006, Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol* 43, 656-66.
36. Brunetti, B., Asproni, P., Beha, G., Muscatello, L.V., Millanta, F., Poli, A., Benazzi, C., Sarli, G., 2013, Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. *J Comp Pathol* 148, 206-13.
37. Burrai, G.P., Mohammed, S.I., Miller, M.A., Marras, V., Pirino, S., Addis, M.F., Uzzau, S., Antuofermo, E., 2010, Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *BMC Cancer* 10, 156.
38. Burton, J.H., Stanley, S.D., Knych, H.K., Rodriguez, C.O., Skorupski, K.A., Rebhun, R.B., 2016, Frequency and Severity of Neutropenia Associated with Food and Drug Administration Approved and Compounded Formulations of Lomustine in Dogs with Cancer. *J Vet Intern Med* 30, 242-6.
39. Burton, J.H., Venable, R.O., Vail, D.M., Williams, L.E., Clifford, C.A., Axiak-Bechtel, S.M., Avery, A.C., Thamm, D.H., 2015, Pulse-Administered Toceranib Phosphate Plus Lomustine for Treatment of Unresectable Mast Cell Tumors in Dogs. *J Vet Intern Med* 29, 1098-104.
40. Burton, J., Khanna, C., 2014, The role of clinical trials in veterinary oncology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 44, 977-87.
41. Burton, J.H., Mitchell, L., Thamm, D.H., Dow, S.W., Biller, B.J., 2011, Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med* 25, 920-6.
42. Caceres, S., Peña, L., Lacerda, L., Illera, M.J., de Andres, P.J., Larson, R.A., Gao, H., Debeb, B.G., Woodward, W.A., Reuben, J.M., Illera, J.C., 2016, Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer. *Vet Comp Oncol*. May 5. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/vco.12238.
43. Caliarì, D., Zappulli, V., Rasotto, R., Cardazzo, B., Frassinetti, F., Goldschmidt, M.H., Castagnaro, M., 2014, Triple-negative vimentin-positive

- heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. *BMC Vet Res* 10, 185.
44. Camacho, L., Peña, L., Gil, A.G., Martín-Ruiz, A., Dunner, S., Illera, J.C., 2014, Immunohistochemical vascular factor expression in canine inflammatory mammary carcinoma. *Vet Pathol* 51, 737-48.
 45. Carlsten, K.S., London, C.A., Haney, S., Burnett, R., Avery, A.C., Thamm, D.H., 2011, Multicenter Prospective Trial of Hypofractionated Radiation Treatment, Toceranib, and Prednisone for Measurable Canine Mast Cell Tumors. *J Vet Intern Med* 26, 135-141.
 46. Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B., Caramelli, M., 1998, Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol* 119, 263-75.
 47. Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J., Wong, M.L., 2005, Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc* 227, 1625-1629.
 48. Chon, E., McCartan, L., Kubicek, L.N., Vail, D.M., 2012, Safety evaluation of combination toceranib phosphate (Palladia®) and piroxicam in tumour-bearing dogs (excluding mast cell tumours): a phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol* 10, 184-93.
 49. Clemente, M., Sánchez-Archidona, A.R., Sardon, D., Díez, L., Martín-Ruiz, A., Caceres, S., Sassi, F., Dolores Pérez-Alenza, M., Illera, J.C., Dunner, S., Peña, L., 2013, Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *Vet J* 97, 427–432.
 50. Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., 2010, Metastasis of Canine Inflammatory versus Non-Inflammatory Mammary Tumours. *J Comp Path* 143, 157–163.
 51. Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L., 2010, Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol* 47, 265-74.
 52. Clemente, M., De Andrés, P.J., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., 2009, Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec* 165, 78-81.
 53. Corless, C.L., Barnett, C.M., Heinrich, M.C., 2011, Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 11, 865-878.

54. Crawford, A.H., Tivers, M.S., Adamantos, S.E., 2012, Owner assessment of dogs' quality of life following treatment of neoplastic haemoperitoneum. *Vet Rec* 170, 566.
55. Cruz, S.M., Tang, Y.Z., Sarker, S.J., Prevoo, W., Kiyani, I., Beltran, L., Peters, J., Sahdev, A., Bex, A., Powles, T., Gerlinger, M., 2016, Heterogeneous response and progression patterns reveal phenotypic heterogeneity of tyrosine kinase inhibitor response in metastatic renal cell carcinoma. *BMC Med* 14, 185.
56. Cunha, S.C., Corgozinho, K.B., Souza, H.J., Silva, K.V., Ferreira, A.M., 2015, Adjuvant chemotherapy with mitoxantrone for cats with mammary carcinomas treated with radical mastectomy. *J Feline Med Surg* 17, 1000-4.
57. Dagher, E., Dubreil, M., Chaumieau, I., Loussouam, D., Abadie, J., Campone, M., Fanuel, D., Nguyen, F., 2016, C-kit prognostic value in feline invasive mammary carcinomas. *Proceedings Annu Meet ESVONC*, 164.
58. Daly, M., Sheppard, S., Cohen, N., Nabity, M., Moussy, A., Hermine, O., Wilson, H., 2011, Safety of masitinib mesylate in healthy cats. *J Vet Intern Med* 25, 297-302.
59. Dank, G., Chien, M.B., London, C.A., 2002, Activating mutations in the catalytic or juxtamembrane domain of c-kit in splenic mast cell tumors of cats. *Am J Vet Res* 63, 1129-1133.
60. Davis, B.W., Ostrander, E.A., 2014, Domestic Dogs and Cancer Research: A Breed-Based Genomics Approach. *ILAR Journal* 55, 59-68.
61. Dawood, S., Ueno, N.T., Cristofanilli, M., 2008, The medical treatment of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 64-71.
62. De Campos, C.B., Nunes, F.C., Lavalle, G.E., Cassali, G.D., 2014, Use of surgery and carboplatin in feline malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging. *In Vivo* 28, 863-6.
63. De Campos, C.B., Damasceno, K.A., Gamba, C.O., Ribeiro, A.M., Machado, C.J., Lavalle, G.E., Cassali, G.D., 2015, Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *J Feline Med Surg* 18, 1003-1012.
64. De Las Mulas, J.M., Millan, Y., Dios, R.A., 2005, Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 42, 200-212.

65. Decker, B., Parker, H.G., Dhawan, D., Kwon, E.M., Karlins, E., Davis, B.W., Ramos-Vara, J.A., Bonney, P.L., McNiel, E.A., Knapp, D.W., Ostrander, E.A., 2015, Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer-Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res* 13, 993-1002.
66. Demetri, G.D., 2011, Differential properties of current tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Seminars in Oncology* 38, 10–19.
67. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J., 2001, Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 411-7.
68. Denies, S., Sanders, N.N., 2012, Recent progress in canine tumor vaccination: potential applications for human tumor vaccines. *Expert Rev Vaccines* 11, 1375-1386.
69. Denkert, C., Winzer, K.J., Muller, B.M., Weichert, W., Pest, S., Kobel, M., Kristiansen, G., Reles, A., Siegert, A., Guski, H., Hauptmann, S., 2003, Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97, 2978–2987.
70. Dhawan, D., Paoloni, M., Shukradas, S., Choudhury, D.R., Craig, B.A., Ramos-Vara, J.A., Hahn, N., Bonney, P.L., Khanna, C., Knapp, D.W., 2015, Comparative Gene Expression Analyses Identify Luminal and Basal Subtypes of Canine Invasive Urothelial Carcinoma That Mimic Patterns in Human Invasive Bladder Cancer. *PLoS One* 10.
71. Dias Pereira, P., Lopes, C.C., Matos, A.J.F., Santos, M., Gartner, F., Medeiros, R., Lopes, C., 2009, COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J Comp Pathol* 140, 247–253.
72. Dixon, J.R., 1998, The International Conference on Harmonization Good Clinical Practice guideline. *Qual Assur* 6, 65-74.
73. Doré, M., 2011, Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Vet Pathol* 48, 254-65.
74. Doré, M., Lanthier, I., Sirois, J., 2003, Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40, 207-12.
75. Downing, S., Chien, M.B., Kass, P.H., Moore, P.E., London, C.A., 2002, Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 63, 1718–1723.

76. Duffy, M.J., Walsh, S., McDermott, E.W., Crown, J., 2015, Biomarkers in Breast Cancer: Where Are We and Where Are We Going?. *Adv Clin Chem* 71, 1-23.
77. Ebos, J.M., Mastri, M., Lee, C.R., Tracz, A., Hudson, J.M., Attwood, K., Cruz-Munoz, W.R., Jedeszko, C., Burns, P., Kerbel, R.S., 2014, Neoadjuvant antiangiogenic therapy reveals contrasts in primary and metastatic tumor efficacy. *EMBO Mol Med* 6, 1561-76.
78. Egenvall, A., Bonnett, B. N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., Von Euler, H., 2005, Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med* 69, 109-27.
79. Eisenhauer, E.A., O'Dwyer, P.J., Christian, M., Humphrey, J.S., 2000, Phase I clinical trial design in cancer drug development. *J Clin Oncol* 18, 684–92.
80. Elgebaly, A., Menshawy, A., El Ashal, G., Osam, O., Ghanem, E., Omar, A., Negida, A., 2016, Sunitinib alone or in combination with chemotherapy for the treatment of advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast Dis* 28, 91-101.
81. Elmslie, R.E., Glawe, P., Dow, S.W., 2008, Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med* 22, 1373-9.
82. Escriche, P., Borrego, J., 2016, Estudio prospectivo con docetaxel (taxotere®) en tumores mamarios felinos. *Proceedings congreso AMVAC*, 59.
83. Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., Armand, J.P., Scigalla, P., Raymond, E., 2006, Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 24, 25–35.
84. Fazekas, J., Fördös, I., Singer, J., Jensen-jarolim, E., 2016, Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine. *Oncology letters* 12, 2271-2276,
85. Feliciano, M.A., Vicente, W.R., Silva, M.A., 2012, Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 53, 332–337.

86. Fenger, J.M., London, C.A., Kisseberth, W.C., 2014, Canine Osteosarcoma: A Naturally Occurring Disease to Inform Pediatric Oncology. *ILAR Journal* 55, 69-85.
87. Ferrara, N., Kerbel, R.S., 2005, Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.
88. Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2009, The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 7, 230-235.
89. Fleming, J.M., Creevy, K.E., Promislow, D.E.L., 2011, Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *J Vet Intern Med* 25, 187-198.
90. Flory, A.B., Leblanc, A.K., 2005, The Role of Cyclooxygenase in Carcinogenesis and Anticancer Therapy. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 27, 616.
91. Frost, D., Lasota, J., Miettinen, M., 2003, Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet Pathol* 40, 42-54.
92. Gardner, H.L., London, C.A., Portela, R.A., Nguyen, S., Rosenberg, M.P., Klein, M.K., Clifford, C., Thamm, D.H., Vail, D.M., Bergman, P., Crawford-Jakubiak, M., Henry, C., Locke, J., Garrett, L.D., 2015, Maintenance therapy with toceranib following doxorubicin-based chemotherapy for canine splenic hemangiosarcoma. *BMC Vet Res* 11, 131.
93. Gargiulo, D.A., Chermal, C., Joda, L., Lee, Y.J, Pilkington M, Haywood A, Garg S., 2013, Extemporaneous compounding in veterinary practice: a New Zealand perspective. *N Z Vet J* 61, 311-5.
94. Gattino, F., Buracco, P., De Maria, R., 2014, Response to toceranib in dogs with measurable, unresectable, recurrent or metastatic mammary carcinomas. *Proceedings Annu Meet ESVONC 2014*, 56.
95. Gery, S., Koeffler, H.P., 2010, Circadian rhythms and cancer. *Cell Cycle* 9, 1097-1103.
96. Ghosh, N., Chaki, R., Mandal, V., Mandal, S.C., 2010, COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep* 62, 233-44.
97. Giuffrida, M.A., Kerrigan, S.M., 2014, Quality of life measurement in prospective studies of cancer treatments in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 28, 1824-9.

98. Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zapulli, V., 2011, Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 48, 117–131.
99. Gordon, I., Paoloni, M., Mazcko, C., Khanna, C., 2009, The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS Med* 6, 10.
100. Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., Kaidi, A., 2009, The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377-86.
101. Gruntzig, K., Graf, R., Hassig, M., Welle, M., Meier, D., Lott, G., Erni, D., Schenker, N. S., Guscelli, F., Boo, G., Axhausen, K., Fabrikant, S., Folkers, G., Pospischil, A., 2015, The Swiss Canine Cancer Registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol* 152, 161-71.
102. Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A., 2004, The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 361-370.
103. Hahn, K.A., Ogilvie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A., Legendre, A., Powers, B., Leventhal, P.S., Kinet, J.P., Palmerini, F., Dubreuil, P., Moussy, A., Hermine, O., 2008, Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 22, 1301–9.
104. Harper, A., Blackwood, L., 2016, Toxicity and response in cats with neoplasia treated with toceranib phosphate. *J Feline Med Surg* 18. [Epub ahead of print] DOI: 10.1177/1098612X16643124 jfms.com.
105. Harris, R.E., Casto, B.C, Harris, Z.M., 2014, Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World J Clin Oncol* 5, 677–692.
106. Harris, R.E., Chlebowski, R.T., Jackson, R.D., Frid, D.J., Ascenseo, J.L., Anderson, G., Loar, A., Rodabough, R.J., White, E., McTiernan, A., 2003, Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women’s Health Initiative. *Cancer Res* 63, 6096–6101.
107. Hassan, B.B., Elshafae, S.M., Supsavhad, W., Simmons, J.K., Dirksen, W.P., Sokkar, S.M., Rosol, T.J., 2017, Feline Mammary Cancer: Novel Nude Mouse Model and Molecular Characterization of Invasion and Metastasis Genes. *Vet Pathol* 54, 32-43.
108. Hay, M., Thomas, D.W., Craighead, J.L., Economides, C., Rosenthal, J., 2014, Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* 32, 40-51.

109. Hayes, A.A., Money, S., 1985, Feline mammary tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15, 513-20.
110. Heller, D.A., Clifford, C.A., Goldschmidt, M.H., Holt, D.E., Shofer, F.S., Smith, A., Sorenmo, K.U., 2005, Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet Pathol* 42, 776-780.
111. Hellmen, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I.B., Hansson, K., Lindgren, A., 1993, Prognostic factors in canine mammary tumors: A multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30, 20-27.
112. Hermo, G.A., Turic, E., Angelico, D., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Gobello, C., Alonso, D.F., 2011, Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *J Am Anim Hosp Assoc* 47, 21–27.
113. Hiatt, R.A., Haslam, S.Z., Osuch, J., 2009, Breast cancer and the Environment Research Centers. *Environ Health Perspect* 117, 1814-22.
114. Hicks, J., Platt, S., Kent, M., Haley, A., 2015, Canine brain tumours: a model for the human disease? *Veterinary and Comparative Oncology*. May 18. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/vco.12152.
115. Holtermann, N., Kiupel, M., Kessler, M., Teske, E., Betz, D., Hirschberger, J., 2016, Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma. *Vet Comp Oncol* 1, 127-35.
116. Holtermann, N., Kiupel, M., Hirschberger, J., 2016, The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and side effects. *Vet Comp Oncol* Jan 14. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/vco.12207.
117. Huang, J., Zhang, D., Xie, F., Lin, D., 2015, The potential role of COX-2 in cancer stem cell-mediated canine mammary tumor initiation: an immunohistochemical study. *J Vet Sci* 16, 225-31.
118. Hughes, K., Dobson, J.M., 2012, Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Vet J* 194, 19-26.
119. Iliopoulou, M.A., Kitchell, B.E., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2013, Development of a survey instrument to assess health-related quality of life in small animal cancer patients treated with chemotherapy. *J Am Vet Med Assoc* 242, 1679-87.
120. Irie, M., Takeuchi, Y., Ohtake, Y., Suzuki, H., Nagata, N., Miyoshi, T., Kagawa, Y., Yamagami, T., 2015, Masitinib mesylate treatment in a dog with

- gastrointestinal stromal tumors with a c-kit mutation. *J Vet Med Sci* 77, 1535-9.
121. IRIS CKD Guidelines. Staging of CKD based on blood creatinine concentration. <http://www.iris-kidney.com/pdf/staging-of-ckd.pdf#page=7> (acceso Noviembre 22, 2016).
122. Isotani, M., Yamada, O., Lachowicz, J.L., Tamura, K., Yagihara, H., Fujino, Y., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2010, Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of kit are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours. *Br J Haematol* 148, 144–53.
123. Isotani, M., Tamura, K., Yagihara, H., Hikosaka, M., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2006, Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet Immunol Immunopathol* 114, 168-172.
124. Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H., Shii, H., 2005, Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci* 67, 345-347.
125. Jacobs, T.M., Hoppe, B.R., Poehlman, C.E., Ferracone, J.D., Dorenmo, K.U., 2010, Mammary adenocarcinomas in three male cats exposed to medroxyprogesterone acetate (1990-2006). *J Feline Med Surg* 12, 169-74.
126. Jafri, M., Porfiri, E., 2009, A differential response to sunitinib: sustained systemic response paralleled by intra-dural progression in the spine. Should standard response criteria be reviewed?. *Clin Genitourin Cancer* 7, 42-4.
127. Jaillardon, L., Abadie, J., Godard, T., Campone, M., Loussouarn, D., Siliart, B., Nguyen, F., 2015, The dog as a naturally-occurring model for insulin-like growth factor type 1 receptor-overexpressing breast cancer: an observational cohort study. *BMC Cancer* 15, 664.
128. Jakob, J., Simeonova, A., Kasper, B., Ronellenfitsch, U., Wenz, F., Hohenberger, P., 2015, Combined Radiation Therapy and Sunitinib for Preoperative Treatment of Soft Tissue Sarcoma. *Ann Surg Oncol* 22, 2839-2845.
129. Jeglum, K.A., deGuzman, E., Young, K.M., 1985, Chemotherapy of advanced mammary adenocarcinoma in 14 cats. *J Am Vet Med Assoc* 187, 157-60.

130. Jones, C.J., Budsberg, S.C., 2000, Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. *J Am Vet Assoc* 217, 721–729.
131. Kerschbaumer, J., Schmidt, F.A., Grams, A.E., Nowosielski, M., Pinggera, D., Brawanski, K.R., Petr, O., Thomé, C., Tuettenberg, J., Seiz, M., Freyschlag, C.F., 2015, Dual Anti-angiogenic Chemotherapy with Temozolomide and Celecoxib in Selected Patients with Malignant Glioma Not Eligible for Standard Treatment. *Anticancer Res* 35, 4955-60.
132. Keskin, A., Yilmazbas, G., Yilmaz, R., Ozyigit, M.O., Gumen, A., 2009, Pathological abnormalities after long-term administration of medroxyprogesterone acetate in a queen. *J Feline Med Surg* 11, 518-21.
133. Khanna, C., Rosenberg, M., Vail, D.M., 2015, A Review of Paclitaxel and Novel Formulations Including Those Suitable for Use in Dogs. *J Vet Intern Med* 29, 1006–1012.
134. Khanna, C., London, C., Vail, D., Mazcko, C., Hirschfeld, S., 2009, Guiding the Optimal Translation of New Cancer Treatments From Canine to Human Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 15, 5671-5677.
135. Khanna, C., Lindblad-Toh, K., Vail, D., London, C., Bergman, P., Barber, L., Breen, M., Kitchell, B., McNeil, E., Modiano, J.F., Niemi, S., Comstock, K.E., Ostrander, E., Westmoreland, S., Withrow, S., 2006, The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol* 24, 1065-6.
136. Kimmelman, J., Nalbantoglu, J., 2007, Faithful companions: a proposal for neurooncology trials in pet dogs. *Cancer Res* 67, 4541-4.
137. Kirkpatrick, K., Ogunkolade, W., Elkak, A., Bustin, S., Jenkins, P., Ghilchik, M., Mokbel, K., 2002, The mRNA expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* 18, 237-41.
138. Kleibeuker, E.A., Hooven Ten, M.A., Verheul, H.M., Slotman, B.J., Thijssen, V.L., 2015, Combining radiotherapy with sunitinib: lessons (to be) learned. *Angiogenesis* 18, 385-95.
139. Knapp, D.W., Henry, C.J., Widmer, W.R., Tan, K.M., Moore, G.E., Ramos-Vara, J.A., Lucroy M.D, Greenberg, C.B., Greene, S.N., Abbo, A.H., Hanson, P.D., Alva, R., Bonney, P.L., 2013, Randomized Trial of Cisplatin versus Firocoxib versus Cisplatin/Firocoxib in Dogs with Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *J Vet Intern Med* 27, 126–133

140. Knapp, D.W., Richardson, R.C., Chan, T.C., Bottoms, G.D., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., Teclaw, R., Bonney, P.L., Kuczek, T., 1994, Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 8, 273–278.
141. Knapp, D.W., Richardson, R.C., Bottoms, G.D., Teclaw, R., Chan, T.C., 1992, Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 29, 214–218.
142. Knottenbelt, C., Chambers, G., Gault, E., Argyle, D.J., 2006, The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. *J of Small Anim Pract* 47, 14–20.
143. Korn, R.L., Crowley, J.J., 2013, Overview: progression-Free Survival as an Endpoint in Clinical trials with Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 19, 2607-2612.
144. Kristiansen, V.M., Nødtvedt, A., Breen, A.M., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., Jonasdottir, T.J., Grotmol, T., Sørenmo, K., 2013, Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Vet Intern Med* 27, 935–942.
145. Ku, C.K., Kass, P.H., Christopher, M.M., 2016, Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. *Vet Comp Oncol* Aug 15 (Epub ahead of print). DOI: 10.1111/vco.12256.
146. Kubatka, P., Ahlers, I., Ahlersova, E., Adamekova, E., Luk, P., Bojkova, B., Markova, M., 2003, Chemoprevention of mammary carcinogenesis in female rats by rofecoxib. *Cancer Lett* 202, 131–136.
147. Kummar, S., Gutierrez, M., Doroshow, J.H., Murgu, A.J., 2006, Drug development in oncology: classical cytotoxics and molecularly targeted agents. *Br J Clin Pharmacol* 62, 15–26.
148. Lanza-Jacoby, S., Miller, S., Flynn, J., Gallatig, K., Daskalakis, C., Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Sembhi, H., Russo, I.H., 2003, The cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, prevents the development of mammary tumors in Her-2/neu mice. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 1486–1491.
149. Lascelles, B.D.X., Bliklager, A.T., Fox, S.M., Reece, D., 2005, Gastrointestinal tract perforation in dogs treated with a selective cyclooxygenase-2 inhibitor: 29 cases (2002–2003). *J Am Vet Med Assoc* 7, 1112–1117.

150. Lascelles, B.D.X., McFarland, J.M., Swann, H., 2005, Guidelines for safe and effective use of NSAIDs in dogs. *Vet Ther* 6, 237–251.
151. Lavallo, G. E., De Campos, C.B., Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., 2012, Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo* 26, 375–379.
152. Lavallo, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L., Cassali, G.D., 2009, Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol* 46, 1275-80.
153. Lawrence, J., Saba, C., Gogal, R., Lamberth, O., Vandenplas, M.L., Hurley, D.J., Dubreuil, P., Hermine, O., Dobbin, K., Turek, M., 2012, Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells. *Vet Comp Oncol* 10, 143-54.
154. LeBlanc, A.K., Breen, M., Choyke, P., Dewhirst, M., Fan, T.M., Gustafson, D.L., Helman, L.J., Kastan, M.B., Knapp, D.W., Levin, W.J., London, C., Mason, N., Mazcko, C., Olson, P.N., Page, R., Teicher, B.A., Thamm, D.H., Trent, J.M., Vail, D.M., Khanna, C., 2016, Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci Transl Med* 8, 324.
155. LeBlanc, A.K., Mazcko, C., Brown, D.E., Koehler, J.W., Miller, A.D., Miller, C.R., Bentley, R.T., Packer, R.A., Breen, M., Boudreau, C.E., Levine, J.M., Simpson, R.M., Halsey, C., Kisseberth, W., Rossmeisl, J.H., Dickinson, P.J., Fan, T.M., Corps, K., Aldape, K., Puduvali, V., Pluhar, G.E., Gilbert, M.R., 2016, Creation of an NCI comparative brain tumor consortium: informing the translation of new knowledge from canine to human brain tumor patients. *Neuro Oncol* 18, 1209-18.
156. LeBlanc, A.K., Miller, A.N., Galyon, G.D., Moyers, T.D., Long, M.J., Stuckey, A.C., Wall, J.S., Morandi, F., 2012, Preliminary evaluation of serial 18fdg-pet/CT to assess response to toceranib phosphate therapy in canine cancer. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 53, 348-57.
157. Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, N.H., Kim, H.W., Shin, J.I., Sur, J.H., 2015, Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *Vet J* 203, 326-31.
158. Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, N.H., Kim, H.W., Shin, J.I., Yhee, J.Y., Sur, J.H., 2015, Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. *Vet Pathol* 52, 1045-51.

159. Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., DeJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., DeGray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber, M., Gearin, G., Giannoukos, G., Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltsen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C., Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby, M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D., Kieu, A.C., Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W., Leger, J.P., Lennon, N., Leuper, L., LeVine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y., Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus, L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L., Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C., Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P., O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang, P., Pierre, F., Priest, M., Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S., Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J., Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-Thomann, N., Stavropoulos, S., Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Thoulutsang, D.,

- Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiland, M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q., Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A., Lander, E.S., 2005, Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803-819
160. Liu, C.H., Chang, S.H., Narko, K., Trifan, O.C., Wu, M.T., Rouzer, E., Haudenschild, C., Lane, T.F., Hla, T., 2001, Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276, 18563–18569.
161. London, C.A., Gardner, H.L., Mathie, T., Stingle, N., Portela, R., Pennell, M.L., Clifford, C.A., Rosenberg, M.P., Vail, D.M., Williams, L.E., Cronin, K.L., Wilson-Robles, H., Borgatti, A., Henry, C.J., Bailey, D.B., Locke, J., Northrup, N.C., Crawford-Jakubiak, M., Gill, V.L., Klein, M.K., Ruslander, D.M., Thamm, D.H., Phillips, B., Post, G., 2015, Impact of Toceranib/Piroxicam/Cyclophosphamide Maintenance Therapy on Outcome of Dogs with Appendicular Osteosarcoma following Amputation and Carboplatin Chemotherapy: A Multi-Institutional Study. *PLoS One* 10, 4.
162. London, C.A., 2014, Small molecule inhibitors in veterinary oncology practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 44, 893-908.
163. London, C., 2013, Chapter 14. Molecular /Targeted Therapy of Cancer. In: Withrow and McEwen's. 5th edition, Elsevier. *Small Animal Clinical Oncology*. Chapter 27. Tumours of the mammary gland. 538-556.
164. London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M.K., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D.M., Hershey, B., Ettinger, S., Vaughan, A., Alvarez, F., Hillman, L., Kiselow, M., Thamm, D., Higginbotham, M.L., Gauthier, M., Krick, E., Phillips, B., Ladue, T., Jones, P., Bryan, J., Gill, V., Novasad, A., Fulton, L., Carreras, J., McNeill, C., Henry, C., Gillings, S., 2012, Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Vet Comp Oncol* 10, 194-205.
165. London, C.A., 2009, Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med* 24, 106-12.
166. London, C.A., Malpas, P.B., Wood-Follis, S.L., Boucher, J.F., Rusk, A.W., Rosenberg, M.P., Henry, C.J., Mitchener, K.L., Klein, M.K., Hintermeister, J.G., Bergman, P.J., Couto, G.C., Mauldin, G.N., Michels, G.M., 2009, Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral

- toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res* 15, 3856–65.
167. London, C.A., Hannah, A.L., Zadovoskaya, R., Chien, M.B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D.B., McMahon, G., Cherrington, J.M., 2003, Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 9, 2755-2768.
168. London, C.A., Galli, S.J., Yuuki, T., Hu, Z., Helfand, S.C., Geissler, E.N., 1999, Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 27, 689-697.
169. Lorenzova, J., Crha, M., Kecova, H., Urbanova, L., Stavinohova, R., Necas, A., 2010, Patient survival periods and death causes following surgical treatment of mammary gland tumours depending on histological type of tumour: Retrospective study of 221 cases. *Acta Vet Brno* 79, 289-297.
170. Luna, S.P.L., Basilio, A.C., Steagall, P.V.M., Machado, L.P., Moutinho, F.Q., Takahira, R.K., Brandão, C.V., 2007, Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *Am J Vet Res* 68, 258–264.
171. Lynch, S., Savary-Bataille, K., Leeuw, B., Argyle, D.J., 2011, Development of a questionnaire assessing health-related quality-of-life in dogs and cats with cancer. *Vet Comp Oncol* 9, 172-82.
172. Ma, Y., Longley, B.J., Wang, X., Blount, J.L., Langley, K., Caughey, G.H., 1999, Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region of canine mast cell neoplasms. *The Journal of Investigative Dermatology* 112, 165–170.
173. Mainenti, M., Rasotto, R., Carnier, P., Zappulli, V., 2014, Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J* 202, 62-8.
174. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298, 1912–1934.
175. Mansa, S., Palmer, E., Grøndahl, C., Lønaas L., Nyman G., 2007, Long-term treatment with carprofen of 805 dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 160, 427–430.

176. Marconato, L., Buracco, P., Aresu, L., 2015, Perspectives on the design of clinical trials for targeted therapies and immunotherapy in veterinary oncology. *Vet J* 205, 238-43.
177. Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G., Finotello, R., Verganti, S., Valenti, P., Ciaramella, L., Zini, E., 2009, Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *J Am Vet Med Assoc* 235, 967-72
178. Marconato, L., Lorenzo, R.M., Abramo, F., Ratto, A., Zini, E., 2008, Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Vet Comp Oncol* 6, 90–101.
179. Matos, A.J., Faustino, F., Lopes, A.M., Rutteman, G.R., Gärtner, F., 2006, Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Veterinary Record* 158, 626-629.
180. Mauldin, G.N., Matus, R.E., Patnaik, A.K., Bond, B.R., Mooney, S.C., 1988, Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide used in the treatment of selected malignant tumors in 23 cats. *J Vet Intern Med* 2, 60-5.
181. McNeill, C.J., Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Gibeon, L., Durham, A.C., Barber, L.G., Baez, J.L., Overley, B., 2009, Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 23, 123–129.
182. McQuown, B., Arteaga, T., Cunningham, S., Burgess, K., 2014, Palladia® (toceranib phosphate) in the treatment of heart base tumors. Annual Conference Proceedings VCS 123.
183. Mellanby, R.J., Herrtage, M.E., Dobson, J.M., 2003, Owners' assessments of their dog's quality of life during palliative chemotherapy for lymphoma. *J Small Anim Pract.* 44, 100-3.
184. Meinkoth, H.J., Cowell, R.L., 2002, Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32, 1209-1235.
185. Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara, G., Bocchini, V., 2008, Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 22, 976-984.
186. Merrick, C.H., Pierro, J., Schleis, S.E., Sones, E.A., Wright, Z.M., Regan, R.C., Siedlecki, C.T., Bergman, P.J., 2016, Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) toxicity in cats. *Vet Comp Oncol* Apr 4. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1111/vco.12211.

187. Millanta, F., Verin, R., Asproni, P., Giannetti, G., Poli, A., 2012, A case of feline primary inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical findings. *J Feline Med Surg* 14, 420–423.
188. Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., Poli, A., 2006, COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat* 98, 115–120.
189. Millanta F, Lazzeri G, Vannozzi I, Viacava P, Poli A., 2002, Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. *Vet Pathol* 39, 690-6.
190. Mills, S.W., Musil, K.M., Davies, J.L., Hendrick, S., Duncan, C., Jackson, M.L., Kidney, B., Philibert, H., Wobeser, B.K., Simko, E., 2015, Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. *Vet Pathol* 52, 238-249.
191. Mitchell, L., Thamm, D.H., Biller, B.J., 2012, Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 26, 355–62.
192. Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., Lipscomb, T.P, 1999, Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat. *International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals*, 2nd series. *Bulletin of the World Health Organization/American Registry of Pathology* 18-25.
193. Misdorp, W., Hart, A.A., 1976, Prognostic factors in canine mammary cancer. *J Natl Cancer Inst* 56, 779-786.
194. Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S.G., Breen, M., 2015, BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS ONE*. 10, 6.
195. Mohammed, S.I., Khan, K.N., Sellers, R.S., Hayek, M.G., DeNicola, D.B., Wu, L., Bonney, P.L., Knapp, D.W., 2004, Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 479–483.
196. Mohammed, S.I., Bennett, P.F., Craig, B.A., Glickman, N.W., Mutsaers, A.J., Snyder P.W., Widmer, W.R., DeGortari, A.E., Bonney, P.L., Knapp, D.W., 2002, Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Research* 62, 356–358.

197. Mohammed, S.I., Coffman, K., Glickman, N.W., Hayek, M.G., Waters, D.J., Schlittler, D., DeNicola, D.B., Knapp, D.W., 2001, Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64, 1–4.
198. Monteiro-Steagall, B.P., Steagall, P.V., Lascelles, B.D., 2013, Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. *J Vet Intern Med* 27, 1011-9.
199. Morris, J., 2013, Mammary tumours in the cat: size matters, so early intervention saves lives. *J Feline Med Surg* 15, 391-400.
200. Nieto, A., Pena, L., Pérez-Alenza, M.D., Sanchez, M.A., Flores, J.M., Castano, M., 2000, Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37, 239-247.
201. Nguyen, S.M., Thamm, D.H., Vail, D.M., London, C.A., 2015, Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 13, 176-83.
202. Novosad, C.A., Bergman, P.J., O'Brien, M.G., McKnight, J.A., Charney, S.C., Selting, K.A., Graham, J.C., Correa, S.S., Rosenberg, M.P., Gieger, T.L., 2006, Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 42, 110-120.
203. Nyman, H.T., Nielsen, O.L., McEvoy, F.J., Lee, M.H., Martinussen, T., Hellmén, E., Kristensen, A.T., 2006, Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant mammary tumors in dogs. *Am J Vet Res* 67, 985-991.
204. O'Connor, J.K., Avent, J., Lee, R.J., Fischbach, J., Gaffney, D.K., 2004, Cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 1034–1040.
205. O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C., 2013, Longevity and mortality of owned dogs in England. *The Veterinary Journal* 198, 638-643.
206. O'Neill, K., Guth, A., Biller, B., Elmslie, R., Dow, S., 2009, Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. *J Vet Intern Med* 23, 875-81.

207. Olmsted, G.A., Farrelly, J., Post, G.S., Smith, J., 2016, Tolerability of toceranib phosphate (Palladia) when used in conjunction with other therapies in 35 cats with feline oral squamous cell carcinoma: 2009-2013. *J Feline Med Surg* Mar 7. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1177/1098612X16638118.
208. Overley, B., Shofer F.S., Goldschmidt, M.H., Sherer, D., Sorenmo, K.U. 2005, Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 19, 560-563.
209. Page, R., Baneux, P., Vail, D., Duda, L. Olson, P., Anestidou, L., Dybdal, N., Golab, G., Shelton, W., Salgaller, M., Hardy, C., 2016, Conduct, Oversight, and Ethical Considerations of Clinical Trials in Companion Animals with Cancer: Report of a Workshop on Best Practice Recommendations. *J Vet Intern Med* 30, 527–535.
210. Paoloni, M., Webb, C., Mazcko, C., Cherba, D., Hendricks, W., Lana, S., Ehrhart, E.J., Charles, B., Fehling, H., Kumar, L., Vail, D., Henson, M., Childress, M., Kitchell, B., Kingsley, C., Kim, S., Neff, M., Davis, B., Khanna, C., Trent, J., 2014, Prospective molecular profiling of canine cancers provides a clinically relevant comparative model for evaluating personalized medicine (PMed) trials. *PLoS One* 9, 3.
211. Paoloni, M.C., Tandle, A., Mazcko, C., Hanna, E., Kachala, S., Leblanc, A., Newman, S., Vail, D., Henry, C., Thamm, D., Sorenmo, K., Hajitou, A., Pasqualini, R., Arap, W., Khanna, C., Libutti, S.K., 2009, Launching a novel preclinical infrastructure: comparative oncology trials consortium directed therapeutic targeting of TNFalpha to cancer vasculature. *PLoS ONE* 4, 3.
212. Paoloni, M., Khanna, C., 2008, Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 8, 147-156.
213. Paoloni, M.C., Khanna C., 2007, Comparative oncology today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37, 1023–32.
214. Papadopoulou, P.L., Patsikas MN, Charitanti A, Kazakos GM, Papazoglou LG, Karayannopoulou M, Chrisogonidis I, Tziris N, Dimitriadis A., 2009, The lymph drainage pattern of the mammary glands in the cat: a lymphographic and computerized tomography lymphographic study. *Anat Histol Embryol* 38, 292-9.
215. Patrono, C., 2016, Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br J Clin Pharmacol* 82, 957-64.
216. Pellin, M.A., Wouda, R.M., Robinson, K., Tsimbas, K., Kurzman, I.D., Biller, B.J., Vail, D.M., 2016, Safety evaluation of combination doxorubicin and

- toceranib phosphate (Palladia®) in tumour bearing dogs: a phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol* May 5. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/vco.12232.
217. Peña, L., De Andrés, P.J., Clemente, M., Cuesta, P., Pérez-Alenza, M.D., 2013, The prognostic value of histological grading in canine mammary cancer in a prospective study with two-year follow-up. Relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol* 51, 94-105.
218. Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Rodríguez-Bertos, A., Nieto, A., 2003, Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78, 141-8.
219. Pérez-Alenza, M.D., Jimenez, A., Nieto, A.I., Peña, L., 2004, First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res* 6, 300–307.
220. Pérez-Alenza, M.D., Tabanera, E., Peña, L., 2001, Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 219, 1110-1114.
221. Perez Alenza, M.D., Peña, L., del Castillo, N., Nieto, A.I., 2000, Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 41, 287-291.
222. Perroud, H.A., Alasino, C.M., Rico, M.J., Mainetti, L.E., Queralt, F., Pezzotto, S.M., Rozados, V.R., Scharovsky, O.G., 2016, Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib: clinical outcomes and biomarkers of response. *Cancer Chemother Pharmacol* 77, 365-74.
223. Plumbs DC. 2011, *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. Ames, Stockholm, Wis.; Pharma Vet; Distributed by Wiley.
224. Pryer, N.K., Lee, L.B., Zadovaskaya, R., Yu, X., Sukbuntherng, J., Cherrington, J.M., London, C.A., 2003, Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin Cancer Res* 9, 5729–5734.
225. Queiroga, F.L., Raposo, T., Carvalho, M.I., Prada, J., Pires, I., 2011, Canine Mammary Tumours as a Model to Study Human Breast Cancer: Most Recent Findings. *In vivo* 25, 455-466.
226. Queiroga, F.L., Pires, I., Parente, M., Gregorio, H., Lopes, C.S., 2011, COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet J* 189, 77-82.

227. Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I., Lopes, C., 2007, Expression of COX-1 and COX-2 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 136, 177-185.
228. Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005, Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research* 25, 4269–4275.
229. Rangarajan, A., Weinberg, R.A., 2003, Opinion: comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 12, 952–9.
230. Ranger, G.S., 2014, Current concepts in colorectal cancer prevention with cyclooxygenase inhibitors. *Anticancer Res* 34, 6277-82.
231. Rankin, K.S., Starkey, M., Lunec, J., Gerrand, C.H., Murphy, S., Biswas, S., 2012, Of dogs and men: comparative biology as a tool for the discovery of novel biomarkers and drug development targets in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 58, 327-333.
232. Rao, R., Redha, R., Macias-Perez, I., Su, Y., Hao, C., Zent, R., Breyer, M.D., Pozzi, A., 2007, Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J Biol Chem* 282, 16959-68.
233. Raposo, T.P., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F.L., Argyle, D.J., 2016, Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. Jan 17. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1111/vco.12209.
234. Raposo, T., Gregorio, H., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F.L., 2014, Prognostic value of tumour- associated macrophages in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 12, 10-9.
235. Rathore, K., Cekanova, M., 2014, Animal model of naturally occurring bladder cancer: Characterization of four new canine transitional cell carcinoma cell lines. *BMC Cancer* 14, 1-10.
236. Riccardo, F., Aurisicchio, L., Impellizeri, J.A., Cavallo, F., 2014, The importance of comparative oncology in translational medicine. *Cancer Immunol Immunother* 64, 137-148.
237. Rich, J.T., Neely, J.G., Paniello, R.C., Voelker, C.C., Nussenbaum, B., Wang, E.W., 2010, A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngol Head Neck Surg* 143, 331-6.

238. Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., Isola, J., 2002, Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62, 632–635.
239. Rivera, P., von Euler, H., 2011, Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol* 48, 132-146.
240. Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K., von Euler, H., 2009, Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 69, 8770-8774.
241. Robat, C., Budde, J., 2016, Potency and stability of compounded cyclophosphamide: a pilot study. *Vet Comp Oncol*. 2016 Mar 30. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/vco.12210.
242. Robat, C., London, C., Bunting, L., McCartan, L., Stingle, N., Selting, K., Kurzman, I., Vail, D.M., 2012, Safety evaluation of combination vinblastine and toceranib phosphate (Palladia®) in dogs: a phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol* 10, 174-83.
243. Robertson, F.M., Bondy, M., Yang, W., Yamauchi, H., Wiggins, S., Kamrudin, S., Krishnamurthy, S., Le-Petross, H., Bidaut, L., Player, A.N., Barsky, S.H., Woodward, W.A., Buchholz, T., Lucci, A., Ueno, N.T., Cristofanilli, M., 2010, Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin* 60, 351-75.
244. Rouzer, C.A., Marnett, L.J., 2009, Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 50, 29-34.
245. Rowell, J.L., McCarthy, D.O., Alvarez, C.E., 2011, Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine* 17, 380-388.
246. Ruan, J., 2011, Antiangiogenic therapies in non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Cancer Drug Targets* 11, 1030-43.
247. Saba, C., Paoloni, M., Mazcko, C., Kisseberth, W., Burton, J.H., Smith, A., Wilson-Robles, H., Allstadt, S., Vail, D., Henry, C., Lana, S., Ehrhart, E.J., Charles, B., Kent, M., Lawrence, J., Burgess, K., Borgatti, A., Suter, S., Woods, P., Gordon, I., Vrignaud, P., Khanna, C., LeBlanc, A.K., 2016, A Comparative Oncology Study of Iniparib Defines Its Pharmacokinetic Profile and Biological Activity in a Naturally-Occurring Canine Cancer Model. *PLoS One* 11, 2.
248. Sabattini, S., Guadagni Frizzon, M., Gentilini, F., Turba, M.E., Capitani, O., Bettini, G., 2013, Prognostic significance of Kit receptor tyrosine kinase

- dysregulations in feline cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 50, 797-805.
249. Saito, T., Tamura, D., Asano, R., 2014, Usefulness of selective COX-2 inhibitors as therapeutic agents against canine mammary tumors. *Oncol Rep* 31, 1637-44.
250. Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M.A., Bento, M.J., Lopes, C., 2011, Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Vet J* 187, 65–71.
251. Schmidt, B.R., Glickman, N.W., DeNicola, D.B., de Gortari, A.E., Knapp, D.W., 2001, Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, 1783–1786.
252. Shafiee, R., Javanbakht, J., Atyabi, N., Bahrami, A., Kheradmand, D., Safaei, R., Khadivar, F., Hosseini, E., 2013, Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer. *Diagn Pathol* 13, 136.
253. Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R., Mischke, R., 2009, Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol* 38, 521-8.
254. Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W., Nolte, I., 2006, Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med* 20, 1184-1190.
255. Simon, R., 1989, Optimal two-stage designs for phase II clinical trials. *Control Clin Trials* 10, 1–10.
256. Simpson, R.M., Bastian, B.C., Micha, H.T., Webster, J.D., Prasad, M.L., Conway, C.M., Prieto, V.M., Gary, J.M., Goldschmidt, M.H., Esplin, D.G., Smedley, R.C., Piris, A., Meuten, D.J., Kiupel, M., Lee, C.C., Ward, J.M., Dwyer, J.E., Davis, B.J., Anver, M.R., Molinolo, A.A., Hoover, S.B., Rodriguez-Canales, J., Hewitt, S.M., 2014, Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 27, 37-47.
257. Singh Ranger, G., 2016, The role of aspirin in colorectal cancer chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 104, 87-90.

258. Skorupski, K.A., Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., Miller, C.A., Sørenmo, K.U., 2005, Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med* 19, 52-55.
259. Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E.J., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L., 2011, Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Domest Anim* 46, 1112-31.
260. Sontas, B.H., Yuzbasioglu Ozturk, G., Toydemir, T.F., Arun, S.S., Ekici, H., 2012, Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumor: a comparison between cytology and histopathology. *Reprod Domest Anim* 47, 125-30.
261. Sonzogni-Desautels, K., Knapp, D.W., Sartin, E., Doré, M., 2011, Effect of cyclooxygenase inhibitors in a xenograft model of canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 9, 161-71.
262. Sorenmo, K.U., Worley, D.R., Goldschmidt M.H., 2012, Tumors of the mammary gland. In: Withrow, Macewen's Small Animal Clinical Oncology. (5th Ed) St, Louis, MO, Saunders/Elsevier, 538-556.
263. Sorenmo, K., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H., 2011, Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Path* 48, 85-97.
264. Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H., 2009, Canine mammary gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 7, 162-172.
265. Sorenmo, K.U., Goldschmidt, M.H., Shofer, F.S., Goldkamp, C., Ferracone, J., 2004, Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Vet Comp Oncol* 2, 13-23.
266. Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., 2000, Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 14, 266-270.
267. Soslow, R.A., Dannenberg, A.J., Rush, D., Woerner, B.M., Khan, K.N., Masferrer, J., Koki, A.T., 2000, COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer* 89, 2637-2645.

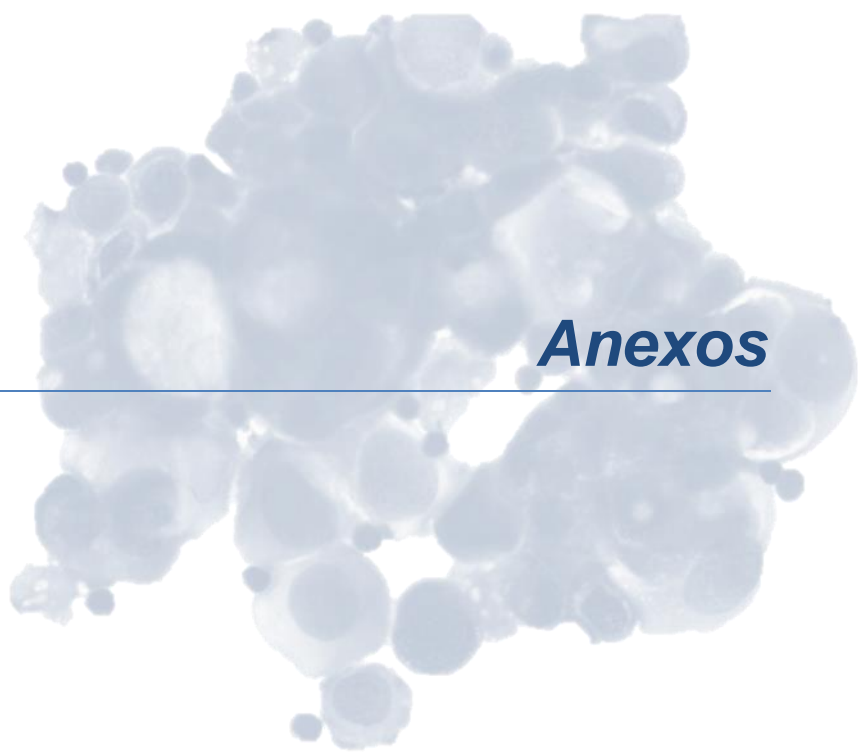
268. Souza, C.H., Toledo-Piza, E., Amorin, R., Barboza, A., Tobias, K.M., 2009, Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J* 50, 506-510.
269. Stapff, M., 2008, *Drug trials: An introduction to clinical trials for doctors, students, medical assistants and interested laymen.* 5th edition. Zuckschwerdt, Munich.
270. Stockhaus, C., Kohn, B., Rudolph, R., Brunnberg, L., Giger, U., 1999, Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *J Small Anim Pract* 40, 326-31.
271. Stolwijk, J.A., Minke, J.M., Rutteman, G.R., Hoekstra, J., Prop, F.J., Misdorp, W., 1989, Feline mammary carcinomas as a model for human breast cancer. II. Comparison of in vivo and in vitro adriamycin sensitivity. *Anticancer Res* 9, 1045-8.
272. Strandberg, J.D., Goodman, D.G., 1974, Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *Am J Pathol* 75, 225-228.
273. Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., Wehrend, A., 2008, Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg* 37, 82-86.
274. Subbaramaiah, K., Dannenberg, A.J., 2003, Cyclooxygenase 2: amolecular target for cancer prevention and treatment. *Trends in pharmacological sciences* 24, 96-102.
275. Sun, B., Zhao, X., Ding, L., Meng, X., Song, S., Wu, S., 2016, Sunitinib as salvage treatment including potent anti-tumor activity in carcinomatous ulcers for patients with multidrug-resistant metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 7, 57894-57902.
276. Susaneck, S.J., Allen, T.A., Hoopes, J., Withrow, S.J., Macy, D.W., 1983, Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 9, 971-976.
277. Szczubial, M., Lopuszynski, W., 2011, Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol* 9, 296-303.
278. Thézé, B., Bernards, N., Beynel, A., Bouet, S., Kuhnast, B., Buvat, I., Tavitian, B., Boisgard, R., 2015, Monitoring therapeutic efficacy of sunitinib using [(18)F]FDG and [(18)F]FMISO PET in an immunocompetent model of luminal B (HER2-positive)-type mammary carcinoma. *BMC Cancer* 15, 534.

279. Thamm, D.H., Vail, D.M., 2015, Veterinary Oncology trials: Design and implementation. *Veterinary Journal* 205, 226-232.
280. Thanan, R., Murata, M., Ma, N., Hammam, O., Wishahi, M., El Leithy, T., Hiraku, Y., Oikawa, S., Kawanishi, S., 2012, Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediators Inflamm* 2012, 165879 8 pages.
281. Thomas, R., Duke, S.E., Wang, H.J., Breen, T.E., Higgins, R.J., Linder, K.E., Ellis, P., Langford, C.F., Dickinson, P.J., Olby, N.J., Breen, M., 2009, "Putting our heads together": insights into genomic conservation between human and canine intracranial tumors. *J Neurooncol* 94, 333-349.
282. Thurston, G., Gale, N.W., 2004, Vascular endothelial growth factor and other signaling pathways in developmental and pathologic angiogenesis. *Int J Hematol* 80, 7-20.
283. Tjostheim, S.S., Stepien, R.L., Markovic, L.E., Stein, T.J., 2016, Effects of Toceranib Phosphate on Systolic Blood Pressure and Proteinuria in Dogs. *J Vet Intern Med* 30, 951-7.
284. Tran, C.M., Moore, A.S., Frimberger, A.E., 2014, Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Vet Comp Oncol* 14, 252-62.
285. Twelves, C., Jove, M., Gombos, A., Awada, A., 2016, Cytotoxic chemotherapy: Still the mainstay of clinical practice for all subtypes metastatic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 100, 74-87
286. Unión Europea. Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 20 de Octubre de 2010, núm. 276, pp. 33-79.
287. Urie, B. K., Russell, D. S., Kisseberth, W. C., London, C. A., 2012, Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors-alpha and-beta, KIT, and RET in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma. *BMC veterinary research* 8, 67.
288. Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., Marconato, L., Abramo, F., Ciliberto, G., Lahm, A., La Monica, N., de Rinaldis, E., 2009, Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10, 135.

289. Vail, D.M., 2007, Cancer clinical trials: development and implementation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37, 1033–57.
290. Valle, J.W., Faivre, S., Hubner, R.A., Grande, E., Raymond, E., 2014, Practical management of sunitinib toxicities in the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Treat Rev* 40, 1230-8.
291. Van der Auwera, I., Colpaert, C., Van Marck, E., Vermeulen, P., Dirix, L., 2006, Lymphangiogenesis in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 30, 1055-6.
292. Van der Auwera, I., Van Laere, S.J., Van den Eynden, G.G., Benoy, I., van Dam, P., Colpaert, C.G., Fox, S.B., Turley, H., Harris, A.L., Van Marck, E.A., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., 2004, Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 10, 7965-71.
293. Van Garderen, E., Schalken, J.A., 2002, Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol Cell Endocrinol* 197, 153-65.
294. Vane, J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M., 1998, Cyclooxygenases 1 and 2. Annual review of pharmacology and toxicology 38, 97-120.
295. Vasudev, N.S., Reynolds, A.R., 2014, Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17, 471-94.
296. Vermeulen, P.B., van Golen, K.L. Dirix, L.Y., 2010, Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern, and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge. *Cancer* 116, 2748-2754.
297. Veterinary cooperative oncology group-common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet Comp Oncol* 2011. [Epub ahead of print], DOI: 10.1111/j.1476-5829.2011.00283.x.
298. Visan, S., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I., Catoi, C., 2016, In vitro comparative models for canine and human breast cancers. *Clujul Med* 89, 38-49.
299. Viste, J.R., Myers, S.L., Singh, B., Simko, E., 2002, Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *Can Vet J* 43, 33-7.
300. Von Euler, H., Rivera, P., Nyman, H., 2013, A dose-finding study with a novel water-soluble formulation of paclitaxel for the treatment of malignant high-grade solid tumours in dogs. *Vet Comp Oncol* 11, 243-55.

301. Wahl, R.L., Jacene, H., Kasamon, Y., Lodge, M.A., 2009, From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 50, 122–50.
302. Wang, Z., Wang, M., Yang, F., Nie, W., Chen, F., Xu, J., Guan, X., 2014, Multitargeted antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors combined to chemotherapy in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur j Clin Pharmacol* 70, 531-8.
303. Waters, D.J., Wildasin, K., 2006, Cancer clues from pet dogs. *Sci Am* 295, 94-101.
304. Welti, J.C., Powles, T., Foo, S., Gourlaouen, M., Preece, N., Foster, J., Frentzas, S., Bird, D., Sharpe, K., van Weverwijk, A., Robertson, D., Soffe, J., Erler, J.T., Pili, R., Springer, C.J., Mather, S.J., Reynolds, A.R., 2012, Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis* 15, 623-41.
305. Wiles, V., Hohenhaus, A., Lamb, K., Zaidi, B., Camps-Palau, M., Leibman, N., 2016, Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats with oral squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg* Jan 11. [Epub ahead of print], DOI: 10.1177/1098612X15622237.
306. Wu, P., Nielsen, T.E., Clausen, M.H., 2016, Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov Today* 21, 5-10.
307. Xin, X., Majumder, M., Girish, G.V., Mohindra, V., Maruyama, T., Lala, P.K., 2012, Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model. *Lab Invest* 92, 1115-28.
308. Yang, S.X., Steinberg, S.M., Nguyen, D., Wu, Y.D., Modrusan, Z., Swain, A.M., 2009, Gene expression profile and angiogenic marker correlates of response to neoadjuvant bevacizuman (BV) followed by BV plus chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 5893-5899.
309. Yang, W.T., Le-Petross, H.T., Macapinlac, H., Carkaci, S., Gonzalez-Angulo, A.M., Dawood, S., Resetkova, E., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., 2008, Inflammatory breast cancer: PET/CT, MRI, mammography, and sonography findings. *Breast Cancer Res Treat* 109, 417-26.
310. Yiannakopoulou, E.Ch., 2015, Aspirin and NSAIDs for breast cancer chemoprevention. *Eur J Cancer Prev* 24, 416-21.

311. Zappulli, V., Rasotto, R., Caliri, D., Mainenti, M., Peña, L., Goldschmidt, M.H., Kiupel, M., 2015, Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of the literature. *Vet Pathol* 52, 46-60.
312. Zemke, D., Yamini, B., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2002, Mutation in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 39, 529–535.
313. Zemke, D., Yamini, B., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2001, Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 341–345.
314. Zon, R., Meropol, N.J., Catalano, R.B., Schilsky, R.L., 2008, American Society of Clinical Oncology statement on minimum standards and exemplary attributes of clinical trial sites. *J Clin Oncol* 26, 2562–2567.



Anexos

ANEXO 1

Estudio Prospectivo con Palladia® en tumores mamarios felinos

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Entiendo que los veterinarios de este centro están involucrados en la investigación del origen y el tratamiento del cáncer en animales de compañía. Los detalles del estudio en tumores mamarios con Palladia® han sido explicado en detalle por:

Veterinario _____ Nº de colegiado _____ Día _____

Como parte de este estudio, entiendo lo siguiente:

1. Para poder participar en este estudio, mi gato debe tener un diagnóstico de tumor mamario confirmado por citología o histopatología.
2. Mi gato no ha recibido ningún tratamiento con quimioterapia en las últimas dos semanas
3. El objetivo del estudio es valorar respuestas y toxicidades de la administración de Palladia®. El Palladia® a pesar de haberse utilizado con anterioridad en gatos y que en general se tolera muy bien no se ha descrito su perfil de toxicidad en gatos. Palladia® ha demostrado efectividad anticancerígena en diferentes tipos de tumores. Sin embargo, entiendo que puede que mi gato no se beneficie de sus efectos y que su tumor no responda.
4. Los fármacos y el diseño del estudio se han realizado de manera que se eviten los efectos secundarios indeseados. A pesar de ello, entiendo que estos efectos secundarios pueden ocurrir, tanto de forma leve como grave (incluyendo la muerte).
5. Se han discutido otras alternativas de tratamiento además de este estudio, y entiendo los beneficios relativos de dichas terapias.
6. Mi gato va a recibir Palladia® administrado de forma oral una vez al día de forma alternante. Si mi gato desarrolla efectos secundarios se podrá reducir la dosis de Palladia® y, dependiendo de la gravedad de los mismos, se podrá suspender el tratamiento durante unos días o por completo si son muy graves. Si esto último ocurriese, el veterinario discutirá conmigo las opciones de tratamiento alternativas de que dispondría en ese momento.
7. La realización de pruebas complementarias (analíticas de sangre y orina, radiografías y ecografías) son una parte fundamental del estudio y se realizarán a los intervalos indicados por el veterinario a cargo del caso, siguiendo el protocolo del estudio, por lo que me comprometo a respetar el calendario establecido acudiendo a todas las visitas programadas.
8. No debo administrar a mi gato otros tratamientos (relacionados o no con su cáncer) sin consultar con el veterinario responsable del estudio y recibir su aprobación.
9. El veterinario considerará la retirada de mi gato del estudio si la enfermedad cancerígena progresa y/o los efectos secundarios son demasiado severos.
10. Doy permiso para que se publiquen los resultados obtenidos en este estudio y que así se beneficie la comunidad científica y se pueda avanzar en el estudio y tratamiento del cáncer en animales de compañía. Entiendo que mi gato no será identificado individualmente en dichos estudios
11. Puedo y debo discutir este estudio con mi veterinario habitual para recibir su consejo en el caso de que me haya remitido al centro donde se realiza el estudio
12. Puedo retirar del estudio a mi gato en cualquier momento.
13. El coste del fármaco será sufragado íntegramente por el estudio clínico mientras que exista enfermedad estable o una respuesta, duren el tiempo que duren. El coste de las pruebas complementarias y manejo de posibles efectos secundarios correrá a mi cargo

Después de mi conversación acerca del estudio con el veterinario _____ y leer todos los puntos de este consentimiento, yo _____, con DNI nº _____ accedo voluntariamente a incluir a mi gato (nombre), con número de identificación _____ en este estudio clínico. Acepto la participación en el estudio y seguiré las instrucciones del veterinario a cargo en cuanto a tratamiento y seguimiento.

Firma

propietario

Fecha _____

Firma

veterinario

Fecha _____

ANEXO 2

Estudio Prospectivo con Palladia® en tumores mamarios felinos.

PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Objetivo del estudio

En este estudio pretendemos evaluar cuál es la respuesta clínica de los tumores mamarios felinos fosfato de Toceranib (Palladia®). Se evaluará tanto la respuesta en pacientes con enfermedad macroscópica como los posibles efectos secundarios.

Criterios de Inclusión

- Pacientes diagnosticados mediante citología o histopatología con un tumor mamario, presentándose con enfermedad macroscópica, primaria o metastática.
- En el caso de pacientes que estén recibiendo fármacos quimioterápicos o prednisona se requerirá un periodo de interrupción de administración de, al menos, 2 semanas.

Criterios de Exclusión

- Preexistencia de anomalías hematológicas > grado 2. (clasificación VCOG-CTCAE)
- Preexistencia de azotemia en el análisis bioquímico (BUN, creatinina) > grado 2. (clasificación VCOG-CTCAE)
- Preexistencia de síntomas gastrointestinales > grado 2. (clasificación VCOG-CTCAE)
- Si la supervivencia estimada debida al tumor no supera los 2 meses

Evaluación previa al inicio del tratamiento (Protocolo de evaluación)

- Exploración física
- Medición y elección de las lesiones diana
- Hemograma, bioquímica (al menos BUN, Crea, ALT, ALKP, Glu, PT) y urianálisis (deben realizarse durante la semana previa a iniciar el tratamiento)
- Radiografías torácicas. Estudio de tres vistas (LLD,LLI,DV/VD) (deben realizarse durante la semana previa a iniciar el tratamiento)
- Ecografía abdominal
- Consentimiento escrito por parte del dueño

Tratamiento

- Todos los gatos recibirán Palladia® una dosis entre 2.25-3.25 mg/kg/48 h comenzando en el día 0. En caso de que la dosis sea inferior o superior a ese margen se deberá consultar con el investigador principal para definir la dosis y método de administración.

Evaluación del tratamiento

- A las 2 semanas de iniciar el tratamiento se realizará una exploración física, hemograma.
- Al mes de iniciar el tratamiento se evaluará la respuesta al mismo y su toxicidad repitiendo el protocolo de evaluación descrito anteriormente
- La respuesta al tratamiento se evaluará siguiendo los criterios del sistema RECIST
 - ◆ RC (Respuesta completa) = Desaparición del tumor
 - ◆ RP (Respuesta parcial) = Reducción del 30% en la suma de los diámetros más largos de las lesiones diana
 - ◆ EE (Enfermedad estable) = Casos que no se engloban en las categorías de PR o CR

- ◆ EP (Enfermedad progresiva) = Incremento del 20% en la suma de los diámetros más largos de las lesiones diana.
- Si el paciente manifiesta EP en alguna de las evaluaciones de respuesta se suspenderá el tratamiento. En los demás casos, continuará con el mismo.
- En pacientes con toxicidad limitante de dosis se interrumpirá al tratamiento. Se consideran toxicidades limitantes de dosis aquellas de grado III o IV (hematológicas, renales, gastrointestinales siguiendo la clasificación VCOG-CTCAE), que son refractarias al tratamiento de soporte recomendado o que duran más de 7 días. El resto de animales con toxicidades grado I o II se manejarán con las terapias de soporte habituales.
- Se admitirán reducciones en la dosis de Palladia® siempre que se mantengan por encima de 2.25mg/kg, disminución de frecuencia (administración lunes, miércoles, viernes descansando el fin de semana, o administración cada 3 días) así como suspensiones temporales (habitualmente 5-7 días) en el tratamiento, si se producen toxicidades que lo requieran.
- Para aquellos gatos que continúen con el tratamiento después del primer mes se repetirán las revisiones de respuesta mensuales repitiendo el protocolo de evaluación descrito anteriormente.

ANEXO 3

Estudio Clínico fase I/II: Palladia® + Rimadyl®
 CARCINOMAS INFLAMATORIOS DE MAMA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Entiendo que los veterinarios de este centro están involucrados en la investigación del origen y el tratamiento del cáncer en animales de compañía. Los detalles del estudio en carcinomas inflamatorios de mama con Palladia® y Rimadyl® han sido explicado en detalle por:

Veterinario _____ N° de colegiado _____ Día _____

Como parte de este estudio, entiendo lo siguiente:

1. Para poder participar en este estudio, mi perro debe tener un diagnóstico de carcinoma inflamatorio de mama confirmado por histopatología.
2. Mi perro no ha recibido ningún tratamiento con quimioterapia en las últimas dos semanas
3. El objetivo del estudio es valorar respuestas y toxicidades de la combinación de Palladia y Rimadyl®. Ambos fármacos han sido ampliamente estudiados en perros, por lo que se conocen sus posibles efectos secundarios. Palladia ha demostrado efectividad anticancerígena en diferentes tipos de tumores y Rimadyl® también ha generado respuestas en variedad de malignidades. Sin embargo, entiendo que puede que mi perro no se beneficie de sus efectos y que su tumor no responda.
4. Los fármacos y el diseño del estudio se han realizado de manera que se eviten los efectos secundarios indeseados. A pesar de ello, entiendo que estos efectos secundarios pueden ocurrir, tanto de forma leve como grave (incluyendo la muerte).
5. Se han discutido otras alternativas de tratamiento además de este estudio, y entiendo los beneficios relativos de dichas terapias.
6. Mi perro va a recibir Palladia y Rimadyl® administrado de forma oral una vez al día de forma alternante. Comenzará con Palladia el primer día para después tomar Rimadyl® el segundo día, Palladia el tercer día y así sucesivamente. Si mi perro desarrolla efectos secundarios se podrá reducir la dosis de Palladia y, dependiendo de la gravedad de los mismos, se podrá suspender el tratamiento durante unos días o por completo si son muy graves. Si esto último ocurriese, el veterinario discutirá conmigo las opciones de tratamiento alternativas de que dispondría en ese momento.
7. La realización de pruebas complementarias (analíticas de sangre y orina, radiografías y ecografías) son una parte fundamental del estudio y se realizarán a los intervalos indicados por el veterinario a cargo del caso, siguiendo el protocolo del estudio, por lo que me comprometo a respetar el calendario establecido acudiendo a todas las visitas programadas.
8. No debo administrar a mi perro otros tratamientos (relacionados o no con su cáncer) sin consultar con el veterinario responsable del estudio y recibir su aprobación.
9. El veterinario considerará la retirada de mi perro del estudio si la enfermedad cancerígena progresa y/o los efectos secundarios son demasiado severos.
10. Doy permiso para que se publiquen los resultados obtenidos en este estudio y que así se beneficie la comunidad científica y se pueda avanzar en el estudio y tratamiento del cáncer en animales de compañía. Entiendo que mi perro no será identificado individualmente en dichos estudios
11. Puedo y debo discutir este estudio con mi veterinario habitual para recibir su consejo en el caso de que me haya remitido al centro donde se realiza el estudio
12. Puedo retirar del estudio a mi perro en cualquier momento.

Después de mi conversación acerca del estudio con el veterinario _____ y leer todos los puntos de este consentimiento, yo _____, con DNI nº _____ accedo voluntariamente a incluir a mi perro (nombre), con número de identificación _____ en este estudio clínico. Acepto la participación en el estudio y seguiré las instrucciones del veterinario a cargo en cuanto a tratamiento y seguimiento.

Firma

propietario

Fecha _____

Firma

veterinario

Fecha _____

ANEXO 4

Estudio Clínico fase II: Palladia® + Rimadyl® CARCINOMAS INFLAMATORIOS DE MAMA		
PROTOCOLO		
SEMANA ESTUDIO	FECHA (DDMMAA)	PROCEDIMIENTOS
Pretratamiento		Exploración física <input type="checkbox"/> Medición lesiones diana <input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Bioquímica <input type="checkbox"/> Urianálisis <input type="checkbox"/> Radiografías de tórax <input type="checkbox"/> Ecografía de abdomen <input type="checkbox"/> Consentimiento informado <input type="checkbox"/> Formulario de calidad de vida <input type="checkbox"/> Diario efectos secundarios dueño <input type="checkbox"/>
Iniciar tratamiento		Palladia® dosis: Rimadyl® dosis:
2 semanas		Exploración física <input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Formulario de calidad de vida <input type="checkbox"/>
4 semanas		Exploración física <input type="checkbox"/> Medición lesiones diana <input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Bioquímica <input type="checkbox"/> Urianálisis <input type="checkbox"/> Radiografías de tórax <input type="checkbox"/> Ecografía de abdomen <input type="checkbox"/> Consentimiento informado <input type="checkbox"/> Formulario de calidad de vida <input type="checkbox"/>
8 semanas		Exploración física <input type="checkbox"/> Medición lesiones diana <input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Bioquímica <input type="checkbox"/> Urianálisis <input type="checkbox"/> Radiografías de tórax <input type="checkbox"/> Ecografía de abdomen <input type="checkbox"/> Consentimiento informado <input type="checkbox"/> Formulario de calidad de vida <input type="checkbox"/>
12 semanas		Exploración física <input type="checkbox"/> Medición lesiones diana <input type="checkbox"/> Hemograma <input type="checkbox"/> Bioquímica <input type="checkbox"/> Urianálisis <input type="checkbox"/> Radiografías de tórax <input type="checkbox"/> Ecografía de abdomen <input type="checkbox"/> Consentimiento informado <input type="checkbox"/> Formulario de calidad de vida <input type="checkbox"/>
Repetición del protocolo de evaluación mensual en adelante		

ANEXO 5**Estudio Clínico fase II: Palladia® + Rimadyl®
CARCINOMAS INFLAMATORIOS DE MAMA****PROTOCOLO DEL ESTUDIO**Objetivo del estudio

En este estudio pretendemos evaluar cuál es la respuesta clínica a la combinación de fosfato de Toceranib (Palladia) junto a carprofeno (rimadyl) en perras diagnosticadas con carcinomas inflamatorios de mama. También se pretende evaluar la toxicidad del protocolo en los pacientes que reciben esta combinación, así como el impacto en su calidad de vida.

Criterios de Inclusión

- Pacientes diagnosticados histopatológicamente de carcinoma inflamatorio de mama, independientemente de presentarse con enfermedad macroscópica o microscópica, con o sin presencia de enfermedad metastática.
- Debe existir un periodo de interrupción de administración de fármacos para aquellos pacientes que estén siendo tratados con AINEs (incluyendo carprofeno) de, al menos, 3 días.
- En el caso de pacientes que estén recibiendo fármacos quimioterápicos o prednisona se requerirá un periodo de interrupción de administración de, al menos, 2 semanas.
- La utilización de otros fármacos analgésicos como puede ser tramadol, sera aceptado siempre y cuando el paciente lleve al menos 5 días recibiendo el fármaco.

Criterios de Exclusión

- Preexistencia de anomalías hematológicas > grado 2. (clasificación VCOG-CTCAE)
- Preexistencia de azotemia en el análisis bioquímico (BUN, creatinina) > grado 2. (clasificación VCOG-CTCAE)
- Preexistencia de síntomas gastrointestinales > grado 2. (clasificación VCOG-CTCAE)

Evaluación previa al inicio del tratamiento (Protocolo de evaluación)

- Exploración física
- Medición y elección de las lesiones diana
- Hemograma, bioquímica (al menos BUN, Crea, ALT, ALKP, Glu, PT) y urianálisis (deben realizarse durante la semana previa a iniciar el tratamiento)
- Radiografías torácicas. Estudio de tres vistas (LLD,LLI,DV/VD) (deben realizarse durante la semana previa a iniciar el tratamiento)
- Ecografía abdominal
- Formulario de calidad de vida
- Consentimiento escrito por parte del dueño

Tratamiento

- Todos los perros recibirán Palladia□ a una dosis entre 2.4-3.25 mg/kg Lunes, miércoles y viernes, descansando el fin de semana, comenzando en el día 0.
- El carprofeno se administrará cada 24h a una dosis de 4.4 mg/kg en una sola toma o dos tomas separadas 12h de 2.2 mg/kg.

Evaluación del tratamiento

- Los dueños dispondrán de un diario donde podrán evaluar la toxicidad gastrointestinal del protocolo.

- A las 2 semanas de iniciar el tratamiento se realizará una exploración física, hemograma y formulario de calidad de vida. Los resultados se deberán enviar por fax o correo electrónico al centro de especialidad si se realizan en el veterinario de referencia
- Al mes de iniciar el tratamiento se evaluará la respuesta al mismo y su toxicidad repitiendo el protocolo de evaluación descrito anteriormente
- La respuesta al tratamiento se evaluará siguiendo los criterios del sistema RECIST
 - ◆ RC (Respuesta completa) = Desaparición del tumor
 - ◆ RP (Respuesta parcial) = Reducción del 30% en la suma de los diámetros más largos de las lesiones diana
 - ◆ EE (Enfermedad estable) = Casos que no se engloban en las categorías de PR o CR
 - ◆ EP (Enfermedad progresiva) = Incremento del 20% en la suma de los diámetros más largos de las lesiones diana.
- Si el paciente manifiesta EP en alguna de las evaluaciones de respuesta se suspenderá el tratamiento. En los demás casos, continuará con el mismo.
- En pacientes con toxicidad limitante de dosis se interrumpirá al tratamiento. Se consideran toxicidades limitantes de dosis aquellas de grado III o IV (hematológicas, renales, gastrointestinales siguiendo la clasificación VCOG-CTCAE), que son refractarias al tratamiento de soporte recomendado o que duran más de 7 días. El resto de animales con toxicidades grado I o II se manejarán con las terapias de soporte habituales.
- Se admitirán reducciones en la dosis de Palladia siempre que se mantengan por encima de 2.3mg/kg, así como suspensiones temporales en el tratamiento si se producen toxicidades que lo requieran.
- Para aquellos perros que continúen con el tratamiento después del primer mes se repetirán las revisiones de respuesta mensuales repitiendo el protocolo de evaluación descrito anteriormente.

ANEXO 6

CUESTIONARIO CALIDAD DE VIDA

FECHA DEL CUESTIONARIO _____

DUEÑO _____

NOMBRE DE LA PERSONA COMPLETANDO EL
CUESTIONARIO _____

NOMBRE DEL PACIENTE _____

INSTRUCCIONES: Indique su opinión sobre el estado de salud de su mascota, mediante círculos en los números de la escala que se encuentra junto a cada pregunta

EJEMPLO: 1 2 3 4 5
 Desacuerdo Neutral De acuerdo

FELICIDAD					
Mi mascota quiere jugar	1	2	3	4	5
Mi mascota responde a mi presencia	1	2	3	4	5
Mi mascota disfruta de su vida	1	2	3	4	5
ESTADO MENTAL					
Mi mascota tiene mejores días que peores	1	2	3	4	5
Mi mascota duerme mas, esta despierta menos tiempo	1	2	3	4	5
Mi mascota parece adormilada o deprimida, no alerta	1	2	3	4	5
DOLOR					
Mi mascota tiene dolor	1	2	3	4	5
Mi mascota jadea frecuentemente, incluso cuando descansa	1	2	3	4	5
Mi mascota tiembla ocasionalmente	1	2	3	4	5
APETITO					
Mi mascota come su cantidad de comida habitual	1	2	3	4	5
Mi mascota parece que tiene nausea o vomita	1	2	3	4	5
Mi mascota come premios o snacks	1	2	3	4	5
HIGIENE					
Mi mascota se limpia a si misma	1	2	3	4	5
Mi mascota huele a orina o tiene irritación de piel	1	2	3	4	5
El pelo de mi mascota parece graso, o enredado	1	2	3	4	5
TOMA DE AGUA (HIDRATACIÓN)					
Mi mascota bebe la misma cantidad de siempre	1	2	3	4	5
Mi mascota tiene diarrea	1	2	3	4	5
Mi mascota orina la misma cantidad de siempre	1	2	3	4	5
MOVILIDAD					
Mi mascota se mueve con facilidad	1	2	3	4	5
Mi mascota esta acostada todo el día	1	2	3	4	5
Mi mascota esta más activa que nunca	1	2	3	4	5
ESTADO DE SALUD GENERAL					
Estado de salud comparado con la última visita	1	2	3	4	5
	Peor		Igual		Mejor
Estado de salud comparado con antes del diagnóstico de cáncer	1	2	3	4	5
	Peor		Igual		Mejor
Calidad de vida	Mala				Excelente

ANEXO 7

Estudio clínico en Carcinoma Inflamatorio canino Palladia® + Rimadyl®

Nombre del perro: _____

DIARIO DUEÑO ADMINISTRACIÓN FÁRMACO/EFFECTOS SECUNDARIOS

Día del estudio	Fecha	Palladia® (marcar el día)	Rimadyl® (marcar el día)	Vómitos ¿Cuántas veces? (<3/día; 3-5/día; >5/día)	Diarrea ¿Cuántas deposiciones por encima de lo habitual? (>2/día; 2-6/día; >6/día)
0					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					