

Artículo de revisión

Metronomic therapy to manage the veterinary patient with cancer

Terapia metronómica en el manejo del paciente veterinario con cáncer

Terapia metronômica no manejo do paciente veterinário com câncer

María Lucía Correal Suárez^{1, MV, MSc}; Rafaela Bortolotti Vièra^{2, MV, MSc}; Annelise Carla Camplesi^{3 * MV, MSc, PhD}

Fecha correspondencia:

Recibido: 6 de febrero de 2016.

Aceptado: 24 de noviembre de 2017.

Forma de citar:

Correal Suárez ML, Vièra RB, Camplesi AC. Terapia metronómica en el manejo del paciente veterinario con cáncer. Rev. CES Med. Vet. Zoot. Vol 12 (3): 195-210.

[Open access](#)

[© Copyright](#)

[Creative commons](#)

[Ethics of publications](#)

[Peer review](#)

[Open Journal System](#)

DOI: [http://dx.doi.org/10.21615/](http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.12.3.3)

[cesmvz.12.3.3](#)

ISSN 1900-9607

Filiación:

¹ Línea de investigación en oncología y toxicología clínica veterinaria. Facultad de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal/SP – Brasil.

Comparte



Abstract

Cancer is a frequent problem in veterinary practice in small animals; aggressive strategies with several side-effects are used to its control, which has stimulated research of new therapeutic options. The metronomic chemotherapy consists in regular administration of low doses of antineoplastic drugs for long periods of time. Together with its antitumor potential, it is administrated easily and has apparent reduced toxicity, showing clinical benefits within advanced diseases or geriatric and weak patients mainly by angiogenesis inhibition and antitumor immune modulation. In small animals, cyclophosphamide, chlorambucil and lomustine have been used mainly, in some cases associated with other drugs, to treat several kinds of tumors, obtaining clinical advantages and low toxicities. However, current studies are limited, and selection of most doses and intervals use to be empirical, in detriment of therapeutic efficacy. This work aims to evidence the potential use of this kind of antineoplastic chemotherapy in domestic animals, as well as the advances in comprehension of its mechanisms of action, drugs, schedules and toxic effects, trying to do a best and more aware use of this chemotherapy strategy in oncologic patients.

Keywords: *chemotherapy, dogs, low-dose, neoplasm, oncology.*

Resumen

El cáncer es una problemática cada vez más frecuente en la práctica clínica de pequeños animales, para su control se emplean metodologías agresivas con múltiples efectos adversos, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. La quimioterapia metronómica consiste en la administración de bajas dosis de fármacos antineoplásicos, en intervalos regulares y por largos períodos de tiempo. Se destaca por su potencial antineoplásico, facilidad de administración y toxicidad reducida, mostrando beneficio clínico en pacientes geriátricos, debilitados o con cáncer avanzado, logrado principalmente a través de la inhibición de la angiogénesis y la modulación inmune antitumoral. En veterinaria, se relata principalmente el uso de ciclofosfamida, clorambucilo o lomustina, asociados en muchos casos con otros fármacos, para el tratamiento de distintos tipos de tumores,

² Servicio de Oncología Veterinaria, Hospital Veterinario "Governador Laudo Natel", Línea de investigación en oncología y cirugía reconstructiva. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal/SP – Brasil;

³ Línea de investigación en toxicología veterinaria y medicina interna de pequeños animales. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinaria, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal/SP – Brasil.

*Correspondencia: Dirección postal: Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n. Jaboticabal/SP – Brasil. CEP 14884-900.

con respuestas favorables y baja toxicidad. No obstante, los estudios existentes son limitados y en muchos casos la selección de la posología de administración de los fármacos ha sido empírica, perjudicando su eficacia terapéutica. El objetivo de esta revisión es mostrar la utilidad de este tipo de quimioterapia antineoplásica en animales domésticos, los avances en la comprensión de sus mecanismos de acción, fármacos y esquemas utilizados, así como su potencial tóxico, buscando generar mayor conciencia del médico veterinario al utilizar esta modalidad de quimioterapia en pacientes oncológicos.

Palabras clave: *dosis baja, neoplasia, oncología, perros, quimioterapia.*

Resumo

O câncer é um problema cada vez mais comum na rotina clínica de pequenos animais, e para seu controle são utilizadas metodologias agressivas com múltiplos efeitos adversos, o que estimula a busca de novas estratégias terapêuticas. A quimioterapia metronômica consiste na administração de baixas doses de drogas antineoplásicas, em intervalos regulares e por longos períodos de tempo. Chama atenção devido ao seu potencial antineoplásico, facilidade de administração e toxicidade reduzida, mostrando benefício clínico em pacientes geriátricos, debilitados ou com câncer avançado, obtidos principalmente por meio da inibição da angiogênese e da modulação imune antitumoral. Na medicina veterinária, o uso de ciclofosfamida, clorambucil ou lomustina, associado em muitos casos a outras drogas, é relatado principalmente para o tratamento de diferentes tipos de tumores, com respostas favoráveis e baixa toxicidade. No entanto, os estudos existentes são limitados e, em muitos casos, a seleção da posologia da administração das drogas tem sido empírica, prejudicando sua eficácia terapêutica. O objetivo desta revisão é mostrar a utilidade deste tipo de quimioterapia antineoplásica em animais domésticos, os avanços na compreensão de seus mecanismos de ação, fármacos mais indicados e esquemas utilizados, bem como seu potencial tóxico, buscando gerar maior consciência do veterinário ao usar este tipo de quimioterapia em pacientes com câncer.

Palavras-chave: *baixa dose, neoplasia, oncologia, cães, quimioterapia.*

Introducción

El cáncer es un fenómeno cada vez más frecuente en medicina humana y veterinaria. Su manejo sistémico puede ser realizado a través de protocolos de altas dosis de quimioterapia que intentan destruir el mayor número posible de células neoplásicas. Sin embargo, estos protocolos se relacionan con marcados efectos adversos, obligando a realizar interrupciones o acortamientos de la terapia para permitir la recuperación de los tejidos normales. Infortunadamente, estos períodos de descanso se han asociado también con recrecimiento tumoral, metástasis y resistencia a los fármacos¹⁻³, lo que limita su eficacia terapéutica, resaltando la necesidad de nuevas estrategias que permitan el control tumoral con menos efectos adversos.

La quimioterapia metronómica o de baja dosis, se destaca por su potencial antineoplásico, facilidad de administración, bajo costo y toxicidad, con respuestas favorables en pacientes geriátricos, debilitados o con cáncer avanzado⁴, sin embargo, en veterinaria está siendo utilizada cada vez más frecuentemente³, a pesar de que existen interrogantes respecto a su efectividad y sus efectos adversos a largo plazo⁵.

Los mecanismos de acción adjudicados a este tipo de terapia son variados y se enfocan principalmente a modificar el microambiente tumoral y las condiciones que

permiten el desarrollo del mismo⁶. Estas características hacen de la terapia metronómica una alternativa progresista, mucho más específica que las terapias convencionales y con considerablemente menos efectos colaterales sobre los tejidos normales redundando en mayor tolerabilidad y calidad de vida para el paciente⁷.

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer las ventajas y desventajas del uso de este tipo de quimioterapia en pequeños animales, así como mostrar los avances en la comprensión de sus mecanismos de acción, fármacos y esquemas utilizados, así como su potencial tóxico, buscando generar mayor conciencia del médico veterinario con respecto al uso de esta modalidad de quimioterapia en pacientes oncológicos.

Estudio del cáncer como prioridad para la salud humana y animal

El cáncer es una prioridad para la salud mundial por su alto índice de morbimortalidad en todas las especies⁸. En humanos, se considera una de las principales causas de muerte, siendo para 2015 el cáncer de pulmón el más común (1,69 millones de muertes) seguido del cáncer de hígado, colorrectal, gástrico y de mama (571000 muertes), según la Organización Mundial de la Salud⁹. En veterinaria, el panorama no deja de ser alarmante, tanto en las especies de producción por su alto impacto económico que se agrava cuando se relaciona con causas infecciosas como sucede con la enfermedad de Marek en aves y la leucosis bovina en ganado⁸, como en animales de compañía donde es cada vez más preocupante por el aumento en la expectativa de vida de estas especies y el fuerte vínculo afectivo que representan^{8,10}. La incidencia aproximada de cáncer en pequeños animales se calcula en 30% para perros y de 20 a 25% para gatos⁸, siendo los tumores mamarios la causa más frecuente en perras y la tercera causa en gatas, mientras que el linfoma y los tumores de piel son los más frecuentemente diagnosticados tanto en gatas como en machos caninos y felinos¹¹.

El cáncer abarca un conjunto de enfermedades con más de 100 tipos y subtipos que afectan diferentes órganos, causando alteraciones dinámicas en el genoma¹², que modifican los mecanismos de homeóstasis que controlan el crecimiento, la división y la muerte celular, haciendo que un determinado grupo de células pierda el control intrínseco de estos procesos⁸. Entre las alteraciones en la fisiología celular que dirigen el crecimiento neoplásico se enuncian: 1) autosuficiencia en señales de proliferación; 2) insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento; 3) evasión de la muerte celular programada; 4) potencial ilimitado de replicación celular; 5) formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis; 6) metástasis e invasión tisular; 7) reprogramación del metabolismo energético; y 8) evasión al sistema inmune¹³.

Las diferentes estrategias para el control del cáncer buscan atacar estos mecanismos fisiopatológicos de las células neoplásicas. Es importante destacar que el concepto "la cura del cáncer" es desproporcionado a la visión científica, ya que el cáncer es un conjunto de enfermedades que se comportan de forma heterogénea y necesitan de tratamientos igualmente variados. Hasta el momento, la aproximación que viene siendo realizada para el tratamiento del cáncer incluye: terapias locales y sistémicas, como remoción quirúrgica, radioterapia, quimioterapia antineoplásica, inmunoterapia, terapias moleculares, entre otras, aún objeto de múltiples investigaciones¹⁴.

La *quimioterapia antineoplásica* es fundamental en oncología clínica para el tratamiento de diferentes tipos de tumores⁴. La quimioterapia convencional o de máxima dosis tolerada (MDT) ha sido el modelo más utilizado en los últimos 70 años para el tratamiento sistémico del cáncer¹⁵. Consiste en la administración de altas dosis de fármacos

citotóxicos, seguida de períodos de descanso para permitir la recuperación de los tejidos normales que también fueron afectados¹⁶. Estos esquemas se asocian con reducción significativa del volumen tumoral³ al causar muerte celular logarítmica de poblaciones de rápida división¹, empleando mecanismos de acción inespecíficos que incluyen, por ejemplo, interferencia en la replicación del material genético o alteración en la formación de microtúbulos¹⁵.

Esta quimioterapia puede ser efectiva inicialmente, causando regresión tumoral, estabilización de la enfermedad y/o aumento de los tiempos de supervivencia¹⁶. Sin embargo, el daño generado sobre las poblaciones normales, que también son de rápida división, como la mucosa gastrointestinal, los folículos pilosos y las células de la médula ósea, explica muchos de los signos clínicos observados, tales como: náusea, vómito, diarrea, alopecia (Figura 1) y pancitopenias¹⁵, que además de afectar la calidad de vida de los pacientes¹⁶, obligan a interrumpir los protocolos para permitir la recuperación de los tejidos lesionados⁴, lo que también puede ocasionar recrecimiento tumoral, resistencia a los fármacos o aparición de metástasis³.

Además de estos factores, la reducida efectividad de los esquemas convencionales en pacientes con cáncer avanzado o metástasis, hacen discutible su eficacia anti-tumoral, evidenciando muchas de sus limitaciones y estimulando la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento^{1,4,17}.



Figura 1. Alopecia causada por quimioterapia convencional en caninos tratados con carboplatina (izquierda, flechas) y vincristina (derecha, punta de flechas).

Cortesía: Servicio de Oncología Veterinaria, FCAV (Unesp).

Quimioterapia metronómica

También conocida como quimioterapia continua de baja dosis o antiangiogénica (denominación anterior). Consiste en la administración de bajas dosis de fármacos anti-neoplásicos, en intervalos regulares, con reducción o eliminación de las interrupciones entre las dosis y por largos períodos de tiempo¹⁶. Se utiliza hace más de 15 años en medicina humana¹⁶, siendo su uso más reciente en veterinaria³.

Se considera bien tolerada, de fácil administración (cuando es usada oralmente), de bajo costo y toxicidad, reduciendo inclusive el uso de medicamentos de soporte^{2,4,6}. Es también una opción paliativa viable para pacientes debilitados, con enfermedades concomitantes, geriátricos, con cáncer resistente, avanzado o de difícil abordaje quirúrgico⁴. Se reconoce su eficacia contra más de 18 tipos de cáncer, involucrando

distintos sistemas, como gastrointestinal, respiratorio, hematopoyético, neurológico, dermatológico y génito-urinario². Puede ser utilizada simultáneamente con otros fármacos o incluso asociada con quimioterapia convencional^{4,18}. No obstante, se debe reconocer que no sustituye modalidades más intensivas de citorreducción¹⁹.

Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de la quimioterapia metronómica no están totalmente comprendidos²⁰, sin embargo, entre estos se lista: el control de la angiogénesis, la modulación inmune, la inhibición directa del crecimiento tumoral y la inducción de *dormancia* tumoral⁴ (Tabla 1 y Figura 2).

Control de la angiogénesis. La angiogénesis se define como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, siendo un fenómeno fundamental para el crecimiento y la sobrevivencia de los tumores, quienes incentivan la proliferación endotelial para su beneficio en un proceso conocido como *switch* angiogénico, que altera el balance normal entre las moléculas pro y antiangiogénicas¹⁷. Existe suficiente evidencia científica para afirmar que la actividad antitumoral de la quimioterapia metronómica se relaciona con el control de la angiogénesis²¹. No obstante, esta acción es debatida, porque también ha sido asociada con diseminación hematógena de las células neoplásicas y un mayor riesgo de metástasis^{3,22}, obligando a hacer una revisión cuidadosa de este efecto.

Los mecanismos antiangiogénicos se han definido en cuatro aspectos:

1. Disminución de factores de crecimiento promotores de expansión vascular (factor de crecimiento del endotelio vascular – VEGF, básico de fibroblastos – bFGF, derivado de las plaquetas – PDGF, factor inducible por la hipoxia-1 α [HIF-1 α] y familia de las angiopoyetinas) junto con el aumento de inhibidores endógenos de la angiogénesis como la endostatina y la trombospondina 1 (TSP-1)^{6,19,23}, esta última antagonista del VEGF y causante de apoptosis o supresión directa de la proliferación endotelial^{17,21,23}.
2. Los tumores también estimulan la formación de nuevos vasos a partir de células progenitoras endoteliales (CEP's) que migran desde la médula ósea para los lugares de neovascularización^{3,17,21}. La terapia metronómica inhibe la movilización de estas células proangiogénicas, así como impide su regeneración y afecta su viabilidad^{2,20}.
3. Se menciona que la quimioterapia metronómica causa citotoxicidad intrínseca del endotelio del tumor^{4,17} por inducción selectiva de apoptosis²³, dado que las células endoteliales son altamente sensibles a bajas dosis de ciertos agentes cuando se exponen de forma frecuente o continua²¹. La magnitud del efecto citotóxico depende del fármaco utilizado, aunque se sabe que el empleo metronómico de fármacos con tropismo por células endoteliales potencia efectivamente sus efectos antiangiogénicos, como lo muestran algunos estudios computacionales²⁴. Además se asume que la mayor estabilidad genética de estas células dificulta la resistencia farmacológica^{4,17}, sin embargo, los mecanismos asociados con la resistencia del endotelio parecen ser muy diferentes a los que suceden en otros tejidos²⁵.
4. La terapia metronómica puede aumentar la distribución y liberación intratumoral de fármacos y macromoléculas transportadoras de los mismos, gracias a la destrucción selectiva de vasos ineficientes, al reducir la densidad de la microvasculatura tumoral seguido de su maduración morfológica y funcional que resulta en *normalización vascular* mejorando la perfusión y facilitando el ingreso y la acción de los diferentes agentes antineoplásicos^{21,26}.

Tabla 1. Mecanismos de acción reconocidos de la quimioterapia metronómica.

Control de angiogénesis	Engloba inestabilidad de los factores de crecimiento promotores de expansión vascular; aumento de inhibidores endógenos de la angiogénesis ^{6,19} ; inhibición de CEP's ² ; citotoxicidad intrínseca de las células endoteliales ^{4,17} ; y "normalización vascular" o destrucción selectiva de vasos ineficientes ²⁶ .
Modulación inmune antitumoral	Involucra el infiltrado de células de inmunidad innata antitumoral ⁶ , favoreciendo la maduración de células dendríticas y la reducción selectiva de células T reguladoras ² , para ejercer control antitumoral.
Inhibición crecimiento tumoral	Por acción citotóxica directa ⁴ , ejercida principalmente sobre las células "madre" tumorales ²² .
Dormancia tumoral	Arresto en el ciclo celular o equilibrio entre los fenómenos de apoptosis y proliferación ²⁷ .

Modulación inmune. El control de la angiogénesis era considerado el mecanismo de acción más importante de la quimioterapia metronómica, sin embargo, actualmente la modulación inmune del microambiente tumoral se consolida como un mecanismo no menos importante^{6,7,28}.

La habilidad de crecer sin ser detectados por el sistema inmune es otra característica de las células neoplásicas, ejercida al favorecer ambientes inmunosupresores que impiden el ataque de las células de inmunidad innata^{30,31}.

La modulación inmune antitumoral involucra diferentes aspectos para evitar la tolerancia inmunológica a las células neoplásicas y a su vez dificultar la metástasis^{30,31}, entre estos aspectos se incluyen:

1. Reducción selectiva de células con propiedades inmunosupresoras, como células mieloides supresoras²⁸ y linfocitos T reguladores (Treg's: CD4, CD25, CD127, CTLA-4, TGF- β [factor de crecimiento transformante], factor de transcripción de FOXP3, etc.)^{2,28}, que evita la inhibición de poblaciones de células T convencionales (CD4⁺ o CD8⁺) y *Natural Killer* (NK) permitiendo que se restablezca la proliferación de células T periféricas y la inmunidad innata antitumoral^{28,31}.
2. Infiltrado de células de inmunidad innata antitumoral⁶, consecuencia de estimular la proliferación de linfocitos, células de memoria, macrófagos y NK.
3. Estímulo a la maduración de células dendríticas impidiendo que poblaciones inmaduras de estas células expresen TGF- β , necesario para la expansión local de las Treg's³¹.
4. Inducción de las células tumorales apoptóticas a liberar antígenos tumorales que pueden ser captados por las células presentadoras de antígeno, así como estímulo a mecanismos de fagocitosis, procesamiento antigénico o maduración de células dendríticas²⁸.
5. Expresión de moléculas tipo 1 del complejo mayor de histocompatibilidad y ligandos para grupos de NK, estimulando la exposición a calreticulina y proteínas de choque térmico que aumentan la liberación de señalizadores y favorecen la respuesta inmune antitumoral²⁸.

Como se observa, variados mecanismos están involucrados con la modulación inmune, sin embargo, vale la pena destacar que estos varían según el fármaco utilizado, contribuyendo de manera diferente con las respuestas antitumorales³².

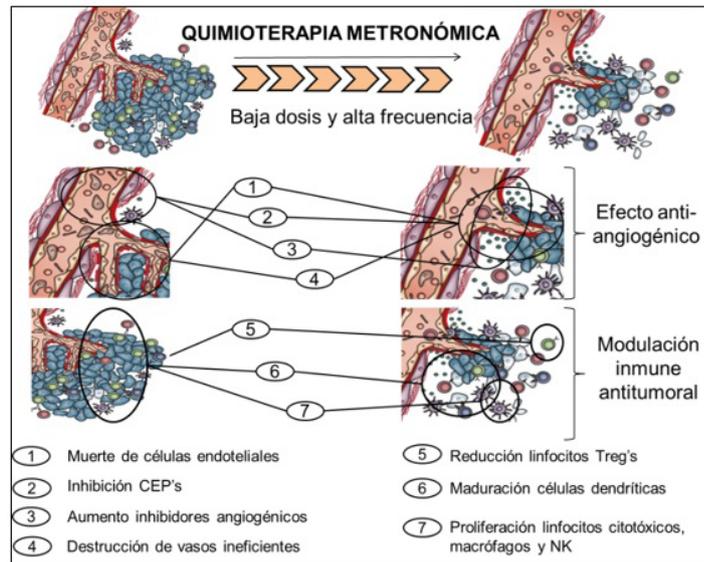


Figura 2. Principales mecanismos de acción de la quimioterapia metronómica sobre células neoplásicas y el microambiente tumoral. Adaptada de Pasquier *et al.* (2010)²⁹.

Inhibición directa del crecimiento tumoral. Control de poblaciones de células “madre” tumorales, fenotipo neoplásico con diferentes características de autorenovación, responsable por la aparición tanto inicial como recurrente del tumor o sus metástasis²². La regulación de estas poblaciones de células regula el crecimiento y la proliferación del tumor, controlando la producción de altos niveles de VEGF y mecanismos de resistencia tumoral producto de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas²³.

Dormancia tumoral. La quimioterapia metronómica puede también promover *dormancia* tumoral, estadio evolutivo del desarrollo neoplásico en el cual las células residuales del tumor permanecen inactivas en respuesta al arresto del ciclo celular (fases G0-G1) o al equilibrio entre fenómenos de apoptosis y proliferación^{27,33}, como consecuencia de dormancia angiogénica, celular e inmunomediada²³, que implica vigilancia inmunológica efectiva⁴.

Esquemas y fármacos utilizados

Desde que se reconocieron las ventajas de los esquemas de baja dosis y alta frecuencia, la administración de quimioterapia metronómica se viene realizando diariamente, dado que se asume como la forma más efectiva de control. Sin embargo, algunos estudios preclínicos en ratones revelaron que la administración regular cada 6 días fue más efectiva, con mayor control del crecimiento tumoral y la aparición de metástasis cuando se comparó con esquemas de administración diaria o a intervalos de 3 días⁶.

En relación a la selección de las dosis metronómicas existe aún mayor controversia²⁴. A pesar de que la quimioterapia metronómica es una modalidad ampliamente utilizada y existen múltiples estudios al respecto, hay suficiente evidencia científica que cataloga la selección de las dosis y los esquemas como un proceso empírico^{17,7,34-40}. Aunque se aconseja el uso de una tercera a una décima parte de la dosis convencional⁴¹ o de 2 a 6% de la máxima dosis tolerada – MDT⁴², estos parámetros no tienen respaldo científico y

frente a la falta de estudios farmacocinéticos específicos, las dosis seleccionadas deben basarse en relatos previos que concilien eficacia y baja toxicidad³⁵. En algunos casos, se pueden utilizar modelos de extrapolación alométrica a partir de datos de otras especies que cuenten con estudios más completos, pero infortunadamente esta metodología no es aplicable a todos los fármacos y puede incurrir en toxicidades⁴³.

Pese a verse limitada por comportamientos biológicos impredecibles, la utilización de modelos computacionales es una opción interesante para determinar efectividad y toxicidad de la quimioterapia metronómica^{34,44}, con el fin de establecer protocolos ideales en términos farmacocinéticos y farmacodinámicos, sin involucrar organismos vivos y a relativo bajo costo, consolidándose como una estrategia prometedora³⁴ y con alto potencial en medicina veterinaria.

Entre los fármacos propuestos para esquemas metronómicos encontramos: ciclofosfamida, vinorelbina, capecitabina, metotrexato, bevacizumab, etopósido, gemcitabina, sorafenib, everolimus, temozolomida, entre otros, que han mostrado efectividad, alta biodisponibilidad oral y sinergia con otros agentes anti-neoplásicos (incluso asociados a esquemas de MDT), fármacos antiinflamatorios, inmunoterapia, terapias moleculares o radioterapia^{3,4,45}.

Varios estudios prospectivos que involucraron entre 18 y 90 pacientes humanos con tumores mamarios metastásicos, cáncer refractario de ovario y próstata, sarcomas, linfoma recidivante y mieloma múltiple que fueron tratados con ciclofosfamida oral asociada con metotrexato, vinorelbina, talidomida, prednisolona, celecoxib, trastuzumab o bevacizumab, mostraron beneficio clínico en 24 a 63% de los casos, aproximadamente^{3,46-49}. Sin embargo, se reconoce que los efectos biológicos pueden llegar a ser opuestos cuando existen discretas diferencias en las dosis utilizadas⁴², sugiriendo que el margen terapéutico de esta modalidad de quimioterapia es reducido, como también se confirma en la práctica clínica, al observar que caninos con sarcomas de tejidos blandos (grado I y II) tratados con 12,5 a 15 mg/m²/día de ciclofosfamida durante 28 días mostraron reducción significativa de las poblaciones de Treg's, pero solo aquellos que recibieron dosis mayores, evidenciaron reducción de la microvasculatura tumoral después de dos semanas de tratamiento⁵.

Una tendencia con gran potencial para optimizar la terapia metronómica es la utilización de nanotransportadores o nanomoléculas^{21,50} (principalmente pegiladas o con encapsulación liposomal) con el objetivo de aumentar la eficacia terapéutica de los quimioterapéuticos que de otro modo tendrían una distribución heterogénea o inadecuada en los tejidos²¹. Estas nanomoléculas desempeñan un papel importante en reducir los efectos tóxicos y las dosis administradas, mejorar la especificidad de los fármacos y/o permitir la liberación sostenida de una sustancia, garantizando la exposición continua de los tejidos al fármaco encapsulado²¹.

En oncología veterinaria, la quimioterapia metronómica está siendo cada vez más utilizada. Biller, en 2014, agrupó nueve investigaciones clínicas, en su mayoría prospectivas, de fase I y II, que mostraron tolerancia y respuesta antitumoral favorable, utilizando ciclofosfamida, clorambucilo o lomustina en diferentes tipos de tumores. Observando mayores intervalos libres de enfermedad que los esquemas convencionales al tratar perros con hemangiosarcoma esplénico con ciclos intercalados de 3 semanas de ciclofosfamida – etopósido y administración diaria de piroxicam⁵¹. Estudios en sarcomas de tejidos blandos tratados con ciclofosfamida y piroxicam también fueron efectivos⁵². En otros tumores el tratamiento diario con ciclofosfamida y celecoxib mantuvo estable la enfermedad en 33% de

los casos⁵³. Perros con carcinoma de células transicionales sin respuesta a tratamientos previos, recibieron clorambucilo metronómico oral mostrando enfermedad estable en 67% de los casos⁵⁴. Un estudio realizado en felinos con diferentes tipos de tumores que recibieron ciclofosfamida en asociación con antiinflamatorios no esteroideos (AINE), toceranib o talidomida mostró beneficios clínicos del 88%⁵⁵.

Más recientemente, Gaspar *et al* (2017) actualiza el compilado agregando seis estudios más, mostrando el creciente interés de la comunidad científica por este tipo de terapia en animales. Trabajos en hemangiosarcomas esplénicos revelan discreto aumento de los tiempos de supervivencia de animales esplenectomizados y tratados simultáneamente con quimioterapia convencional y metronómica que animales que solo recibieron terapia convencional⁵⁶. Sin embargo, otros estudios en perros con diversos tumores muestran que la combinación mencionada puede causar reducción no selectiva de poblaciones de Treg's comprometiendo la modulación inmune anti-tumoral⁵⁷. Aunque de manera interesante, esquemas metronómicos posteriores a la radioterapia hipofraccionada en sarcomas de tejidos blandos mostraron aumentos considerables en los tiempos de supervivencia de pacientes caninos⁵⁸. Todos estos hallazgos señalan el gran potencial de la quimioterapia metronómica en veterinaria, no obstante, también indican la necesidad de más estudios con condiciones más homogéneas, por lo menos en lo que respecta al tipo de tumor, dosis y frecuencia de tratamientos, con el objetivo de obtener conclusiones más confiables.

Además, aunque la quimioterapia metronómica se utilice principalmente como tratamiento paliativo, su indicación clínica comprende varios escenarios: 1) Primera línea de tratamiento en pacientes con enfermedad avanzada, siendo una alternativa segura y potencialmente efectiva^{23,51}. 2) Terapia de consolidación, complementando terapias convencionales con el objetivo de prolongar la remisión en pacientes con alto grado de recurrencia o como terapia adyuvante para destruir células tumorales residuales o micrometástasis²³. 3) Terapia de mantenimiento, como sustituto temporal de protocolos de altas dosis, para ofrecer mejor calidad de vida a los pacientes^{18,23}. Por lo anterior, el clínico debe tener plena conciencia de la situación en la que se encuentra el paciente para informar al propietario adecuadamente y saber qué tipo de respuesta esperar³.

Toxicidad

Se asume tolerancia y baja toxicidad de los esquemas metronómicos cuando se comparan con esquemas convencionales^{17,29,37}, resultado de su reducida citotoxicidad⁶. No obstante, son escasos los estudios que muestran el impacto toxicológico de dosis bajas por largos períodos de tiempo, así como se dificulta discernir si los efectos adversos observados son consecuencia del(os) fármaco(s) utilizado(s), su asociación con otros compuestos⁵⁹ o si fueron potencializados por la condición clínica del paciente⁶⁰ o la presencia del tumor⁶¹.

Por ejemplo, en esquemas convencionales, la ciclofosfamida se asocia con toxicidad reproductiva⁶², alteraciones hematológicas, toxicidad cardíaca, ocular, pulmonar, gastrointestinal, hepática y renal^{60,63}, incluyendo también cistitis hemorrágica estéril⁶⁴, en consecuencia de los efectos de la acroleína, uno de sus metabolitos activos que favorece la peroxidación lipídica^{62,65}. El metotrexato presenta efectos similares en dosis altas, siendo más acentuados los gastrointestinales y la mielosupresión⁶⁰, que inclusive se relacionó con mortalidad por sepsis en 25% de los casos⁶⁶. Es importante destacar, que la dosis metronómica de este fármaco no ha sido determinada en animales domésticos por lo que su empleo en esta modalidad de quimioterapia puede resultar en toxicidades severas.

En oncología pediátrica se evaluó el grado de seguridad de un esquema metronómico en niños con diferentes tumores refractarios o recurrentes, usando vinblastina, ciclofosfamida, metotrexato y celecoxib, observando toxicidades grado III y IV en 62,5% y 25% de los pacientes, respectivamente⁶⁷. En adultos, dosis bajas de capecitabina asociada con cisplatino y trastuzumab mostraron marcadas alteraciones gastrointestinales como náusea, vómito, dolor abdominal, estomatitis y diarrea que se limitaron con la suspensión de la terapia⁶⁸. Mujeres con cáncer de mama metastásico tratadas con ciclofosfamida y metotrexato presentaron leucopenia grado III en 20% de los casos⁴⁶.

En veterinaria, el tratamiento con lomustina obligó a realizar más de 30% de interrupciones por toxicidad gastrointestinal (16%) y hepática (13,6%), cursando con aumento de enzimas hepáticas, neutropenia, trombocitopenia y azotemia progresiva⁶⁹. Así como el tratamiento con clorambucilo metronómico fue de baja toxicidad en animales con carcinoma de células transicionales de vejiga, con un único caso de suspensión de la terapia por toxicidad grave⁵⁴. Las diferentes asociaciones de ciclofosfamida muestran pocos efectos adversos, sin embargo, esquemas involucrando bleomicina se han relacionado con fibrosis y toxicidad pulmonar en animales experimentales⁷⁰, así como asociaciones de ciclofosfamida con piroxicam o etopósido causaron tardíamente cistitis hemorrágica estéril en 10 a 15% de los casos (Figura 3)^{51,52}. Estos tratamientos indujeron toxicidad leve a moderada (40%), caracterizada por alteraciones gastrointestinales y renales, que fueron controladas al disminuir la frecuencia de administración⁵². Esquemas de ciclofosfamida con toceranib o inhibidores COX-2 no mostraron efectos adversos considerables después de 30 o 60 días de tratamiento^{53,71}. En felinos tratados con diferentes protocolos de ciclofosfamida sola o asociada con AINE, toceranib o talidomida se observó 17% de toxicidad gastrointestinal durante el primer mes de tratamiento, 8,3% de toxicidad hematológica y 4,15% renal, todas de grado I, con algunos casos de azotemia grado II y III después de dos meses de tratamiento⁵⁵.



Figura 3. Cistitis hemorrágica estéril en hembra canina tratada por 11 meses con ciclofosfamida metronómica. Coágulo expelido por micción espontánea (izquierda, flechas negras) e imagen ecográfica de masa compatible con coágulo adherido a la pared de la vejiga, que desapareció después de su expulsión (derecha, punta de flecha roja). Cortesía del Servicio de Oncología Veterinaria y Servicio de Diagnóstico por Imágenes, Hospital Veterinario "Governador Laudo Natel", FCAV (Unesp)⁶⁴.

Los anteriores estudios demuestran la importancia de la evaluación toxicológica a largo plazo, mostrando efectos adversos de aparición tardía, sin embargo, se recalca que estos trabajos son muy heterogéneos y no siempre utilizan las dosis biológicamente efectivas lo que obliga a hacer un análisis cuidadoso de las conclusiones. No obstante, es evidente que la quimioterapia metronómica es bien tolerada y su uso en oncología clínica debe ser estimulado.

Conclusiones

La quimioterapia metronómica es una estrategia atractiva para el tratamiento sistémico del cáncer, que explora diferentes mecanismos de acción antitumoral, con una excelente relación costo-beneficio, así como menor toxicidad cuando se compara con los esquemas convencionales y en muchos casos igual o mayor eficacia. No obstante, es importante destacar que el futuro de los esquemas metronómicos debe incluir la búsqueda de evidencias científicas que mejoren la comprensión de esta quimioterapia, incluyendo: asociación con otras modalidades de tratamiento, nuevas tecnologías para determinar dosis biológicamente ideales, mayor entendimiento de los mecanismos de acción, estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos específicos, terapias individualizadas para cada condición, así como el empleo de biomarcadores que permitan monitorear la respuesta a la terapia y predecir el pronóstico clínico. Particularmente en veterinaria se sugiere evaluar el uso de otros fármacos. En todos los casos, se estimula el empleo consciente y riguroso de los esquemas metronómicos, sin dejar de aprovechar sus variados beneficios clínicos.

Agradecimientos

Al Servicio de Oncología Veterinaria y al Servicio de Diagnóstico por Imágenes del Hospital Veterinario "Governador Laudo Natel", FCAV (Unesp), Jaboticabal. Agradecemos al PEC-PG (CNPq) por la financiación de estudios de maestría de uno de los autores.

Referencias

1. Mutsaers AJ. Chemotherapy: new uses for old drugs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37(6): 1079–1090.
2. Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Ueno T, *et al.* Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma. *Transl Oncol* 2013; 6(5): 511–519.
3. Biller B. Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44(5): 817–829.
4. Gnoni A, Silvestris N, Licchetta A, Santini D, Scartozzi M, *et al.* Metronomic chemotherapy from rationale to clinical studies: a dream or reality? *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 95(1): 46–61.
5. Burton JH, Mitchell L, Thamm DH, Dow SW, Biller BJ. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 920 – 926.
6. Chen C, Doloff JC, Waxman DJ. Intermittent metronomic drug schedule is essential for activating antitumor innate immunity and tumor xenograft regression. *Neoplasia* 2014; 16(1): 84–96.
7. Rajasekaran T, Ng Q, Tan DS, Lim W, Ang M, *et al.* Metronomic chemotherapy: A relook at its basis and rationale. *Cancer Lett* 2017; 388: 328–333.
8. Pang LY, Argyle DJ. Veterinary oncology: biology, big data and precision medicine. *Vet J* 2016; 213: 38–45.

9. WHO. Cancer. Media Centre 2017; [acceso: 3 de octubre de 2017]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
10. Schleis, S. E. Cancer screening tests for small animals. *Vet Clin NA Small Anim Pract* 2014; 44:871–881.
11. Breen M. Update on Genomics in veterinary oncology. *Top Companion Anim Med* 2009; 24(3): 113–121.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674.
14. Withrow SJ, Vale DM, Page R. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5ª ed. [S.l.]: Saunders Elsevier; 2012.
15. Takimoto CH. Maximum tolerated dose: clinical endpoint for a bygone era? *Target Oncol* 2009; 4(2): 143–147.
16. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is, more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2000; 105(8): 1045–1047.
17. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(6): 423–436.
18. Loven D, Hasnis E, Bertolini F, Shaked Y. Low-dose metronomic chemotherapy: from past experience to new paradigms in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* 2013; 18(3-4): 193–201.
19. Mutsaers AJ. Metronomic Chemotherapy. *Top Companion Anim Med* 2009; 24(3): 137–143.
20. Bouche G, André N, Banavali S, Berthold F, Berruti A, *et al.* Lessons from the Fourth Metronomic and Anti-angiogenic Therapy Meeting. 24-25 June 2014, Milan. *E Cancer Medical Science* 2014; 8: 1–19.
21. Abu Lila AS, Ishida T. Metronomic chemotherapy and nanocarrier platforms. *Cancer Lett* 2017; 400: 232–242.
22. Martin-Padura I, Marighetti P, Agliano A, Colombo F, Larzabal L, *et al.* Residual dormant cancer stem-cell foci are responsible for tumor relapse after antiangiogenic metronomic therapy in hepatocellular carcinoma xenografts. *Lab Invest* 2012; 92(7): 952–966.
23. Gaspar TB, Henriques J, Marconato L, Queiroga FL. The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs — insight into a modern cancer field. *Vet Comp Oncol* 2017; <https://doi.org/10.1111/vco.12309>.
24. Rodrigues DS, Mancera PFA, Pinho STR. Understanding the antiangiogenic effect of metronomic chemotherapy through a simple mathematical model. *Physica A* 2016; 464: 251–266.

25. Riesco-Martinez M, Parra K, Saluja R, Francia G, Emmenegger U. Resistance to metronomic chemotherapy and ways to overcome it. *Cancer Lett* 2017; 400: 311–318.
26. Ma J, Waxman DJ. Modulation of the antitumor activity of metronomic cyclophosphamide by the angiogenesis inhibitor axitinib. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(1): 79–89.
27. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11): 834–846.
28. Hao Y, Yi S, Ruan J, Zhao L, Nan K. New insights into metronomic chemotherapy-induced immunoregulation. *Cancer Lett* 2014; 354: 220–226.
29. Pasquier E, Kavallaris M, André N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7(8): 455–465.
30. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 2012; 23(8): 8–11.
31. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 641–648.
32. Kerbel RS, Shaked Y. The potential clinical promise of 'multimodality' metronomic chemotherapy revealed by preclinical studies of metastatic disease. *Cancer Lett* 2017; 400: 293–304.
33. Felice F De, Benevento I, Musella A, Musio D, Tombolini V. Metronomic chemotherapy in head and neck cancer. *Cancer Lett* 2017; 400: 219–222.
34. Barbolosi D, Ciccolini J, Meille C, Elharrar X, Faivre C, *et al.* Metronomics chemotherapy: Time for computational decision support. *Cancer Chemother. Pharmacol* 2014; 74: 647–652.
35. Bocci G, Kerbel RS. Pharmacokinetics of metronomic chemotherapy: a neglected but crucial aspect. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13: 1–15.
36. Munoz R, Shaked Y, Bertolini F, Emmenegger U, Man S, *et al.* Anti-angiogenic treatment of breast cancer using metronomic low-dose chemotherapy. *Breast* 2005; 14: 466–479.
37. Lien K, Georgsdottir S, Sivanathan L, Chan K, Emmenegger U. Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. *Eur J Cancer* 2013; 49(16): 3387–3395.
38. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, *et al.* Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood* 2005; 106(9): 3058–3061.

39. Pasquier E, Kieran MW, Sterba J, Shaked Y, Baruchel S, *et al.* Moving forward with metronomic chemotherapy: meeting report of the 2nd International Workshop on Metronomic and Anti-Angiogenic Chemotherapy in Paediatric Oncology. *Transl Oncol* 2011; 4(4): 203–211.
40. Khadka A, Akhoun N. Metronomic chemotherapy: Low dose less toxic anticancer strategy. *Int J Pharmacol Res* 2016; 6: 195–199.
41. Shi H, Jiang J, Ji J, Shi M, Cai Q, *et al.* Anti-angiogenesis participates in antitumor effects of metronomic capecitabine on colon cancer. *Cancer Lett* 2014; 349(2): 128–135.
42. Penel N, Adenis A, Bocci G. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: after 10 years of experience, where do we stand and where are we going? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 82(1): 40–50.
43. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22(3): 659–661.
44. Ledzewicz U, Schattler H. Application of mathematical models to metronomic chemotherapy: What can be inferred from minimal parameterized models? *Cancer Lett* 2017; 401: 74–80.
45. Chen Y, Chang M, Cheng W. Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Cancer Lett* 2017; 400: 282–292.
46. Colleoni M, Rocca A, Sandri MT, Zorzino L, Masci G, *et al.* Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Ann Oncol* 2002; 13(1): 73–80.
47. Orlando L, Cardillo A, Ghisini R, Rocca A, Balduzzi A, *et al.* Trastuzumab in combination with metronomic cyclophosphamide and methotrexate in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 225.
48. Khan OA, Blann AD, Payne MJ, Middleton MR, Protheroe AS, *et al.* Continuous low-dose cyclophosphamide and methotrexate combined with celecoxib for patients with advanced cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(12): 1822–1827.
49. Jung JY, Jang G, Song H, Kim HS, Choi DR, *et al.* Efficacy of metronomic chemotherapy with oral cyclophosphamide and methotrexate in patients with non-Hodgkin lymphoma: a retrospective analysis at a single institution. *Int J Clin Exp Med* 2016; 9(2): 3893–3900.
50. Ishida T, Shiraga E, Kiwada H. Synergistic antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model. *J Control Release* 134, 194–200.
51. Lana S, U'ren L, Plaza S, Elmslie R, Gustafson D, *et al.* Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 764–769.

52. Elmslie RE, Glawe P, Dow SW. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med* 2008; 22(6): 1373–1379.
53. Marchetti V, Giorgi M, Fioravanti A, Finotello R, Citi S, *et al.* First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. *Invest New Drugs* 2012; 30(4): 1725–1730.
54. Schrempp DR, Childress MO, Stewar JC, Tan KM, Gortari AE, *et al.* Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 242(11): 1534–1538.
55. Leo, C, Stell A, Borrego J, Martinez de Merlo E, Ruess-Melzer K, *et al.* Evaluation of low-dose metronomic (LDM) cyclophosphamide toxicity in cats with malignant neoplasia. *J Feline Med Surg* 2014; 16(8): 671–678.
56. Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE, Lyons JA, Lew FH, *et al.* Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *J Am Vet Med Assoc* 2015; 247: 393–403.
57. Rasmussen RM, Kurzman ID, Biller BJ, Guth A, Vail DM. Phase I lead-in and subsequent randomized trial assessing safety and modulation of regulatory T cell numbers following a maximally tolerated dose doxorubicin and metronomic dose cyclophosphamide combination chemotherapy protocol in tumour-bearing dogs. *Vet Comp Oncol* 2017; 15: 421–430.
58. Cancedda S, Marconato L, Meier V, Laganga P, Roos M, *et al.* Hypofractionated radiotherapy for macroscopic canine soft tissue sarcoma: A retrospective study of 50 cases treated with a 5 × 6 Gy protocol with or without metronomic chemotherapy. *Vet Radiol Ultrasound* 2016; 57(1): 75–83.
59. Montagna E, Canello G, Dellapasqua S, Munzone E, Colleoni M. Metronomic therapy and breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2014; 40(8): 942–950.
60. Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy – associated toxicity. *Emerg Med Clin N Am* 2014; 32(1): 167–203.
61. Emmenegger U, Man S, Shaked Y, Francia J, Wong JW, *et al.* A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3994–4000.
62. Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. *Achillea millefolium* inflorescence aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Chin J Nat Med* 2012; 10(4): 247–254.
63. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta* 2005; 364(1-2): 335–342.

64. Viéra RB, Correal ML, Sierra OS, Martinato F, Santos MQP, *et al.* Cistite hemorrágica estéril por uso de ciclofosfamida em cão: relato de caso. *J Bras Ciência An (Anais do Onco in Rio)* 2016; S: 7–10.
65. Masci G, Losurdo A, Gandini C, Garassino I, Di Tomasso L, *et al.* Low-dose 'metronomic chemotherapy' with oral cyclophosphamide and methotrexate in metastatic breast cancer: a case report of extraordinarily prolonged clinical benefit. *Ecancer Medical Science* 2012; 6(1): 1–5.
66. Kivity S, Zafirir Y, Loebstein R, Pazner R, Mouallem M, *et al.* Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: a cohort of 28 patients. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 1109–1113.
67. André N, Abed S, Orbach D, Alla CA, Padovani L, *et al.* Pilot study of a pediatric metronomic 4-drug regimen. *Oncotarget* 2011; 2(12): 960–965.
68. Maggo G, Grover SC, Grin A. Capecitabine induced colitis. *Pathol - Res Pract* 2014; 210(9): 606–608.
69. Tripp CD, Fidel J, Anderson CL, Patrick M, Pratt C, *et al.* Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 2011; 25(2): 278–284.
70. Saba, Khan S, Parvez S, Chaudhari B, Ahmad F, *et al.* Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 58: 210–219.
71. Mitchell L, Thamm DH, Biller BJ. Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 2012; 26(2): 355–362.