

Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos

Determination of C-reactive protein in female dogs with benign and malignant mammary tumors

R Crossley^a, A Coloma^a, C Ríos^{a*}, C González^b

^aFacultad de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile.

^bFacultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

SUMMARY

The aim of this study was to determine C-reactive protein levels in dogs with benign and malignant mammary tumors. Thirty female dogs, with ages ranging between 6 and 15 years and with no distinction of breed were used for this purpose. The animals were divided into 3 different groups of 10 dogs each: Group 1 (control), Group 2 (benign mammary tumor) and Group 3 (malignant mammary tumor). The neoplasias were classified histologically and C-reactive protein (CRP) levels were analyzed using a human turbidimetric immunoassay validated for dogs. Group 3 had the highest values (mean: 8.2 mg/L; median: 7.1 mg/L) of C-reactive protein compared with the other groups ($P < 0.05$). According to a discriminant analysis, a female dog with a mammary tumor and CRP values ≥ 8 mg/L has a 61% or greater probability of this tumor being malignant.

Palabras clave: proteína C-reactiva, neoplasia mamaria, maligna.

Key words: C-reactive protein, mammary tumors, malignant.

INTRODUCCIÓN

Los tumores de la glándula mamaria en hembras caninas constituyen más del 52% del total de las neoplasias en éstas (Egenvall y col 2005, Itoh y col 2005). Con frecuencia es difícil diferenciar mediante criterios clínicos entre nódulos mamarios benignos y malignos. Es más, en sus primeros estadios, los tumores benignos y malignos no se diferencian en nada (Kitchell 1999). La diferenciación mediante citología es difícil, por lo tanto, el estudio histopatológico continúa siendo el método diagnóstico de elección (Knapp y col 2002, Madewell 2003).

Las proteínas de fase aguda son consideradas marcadores útiles de la inflamación en diagnóstico clínico, pronóstico y monitoreo de tratamiento en diversas patologías tanto agudas como crónicas (Martínez-Subiela y col 2004, Martínez-Subiela y Cerón 2005). Además, han sido usadas en medicina veterinaria como marcadores para animales con cáncer (Madewell 1997).

La proteína C-reactiva corresponde a una proteína de fase aguda predominantemente sintetizada por el hígado y regulada por citoquinas proinflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleukina seis (IL-6) (Aziz y col 2003). Tiene un peso molecular de 100 kDa, consistente en 5 subunidades de 20 kDa cada una (Caspi

y col 1984). Las principales actividades biológicas de esta proteína son: activación del complemento y opsonización bacteriana, modulación de monocitos, macrófagos y producción de citoquinas, unión a cromatina bacteriana y prevención de migración tisular de neutrófilos (Petersen y col 2004). Su concentración sérica se puede determinar a través de diversas pruebas como: Elisa, aglutinación reversa rápida en látex, inmunodifusión, electroinmunoensayo y ensayo inmunoturbidimétrico (Hayashi y col 2001, Kjølgaard-Hansen y col 2003^b). Un ensayo inmunoturbidimétrico automático para proteína C-reactiva sérica humana ha sido validado para mediciones de concentración sérica de esta proteína en caninos, lo que constituye un método rápido y de uso apropiado para la rutina en laboratorios diagnósticos (Kjølgaard-Hansen y col 2003^a).

Estudios recientes realizados en humanos sugieren a la proteína C-reactiva como potencial biomarcador de un mayor de riesgo de cáncer (Allin y col 2009).

El objetivo principal de este estudio fue determinar los valores séricos de proteína C-reactiva (CRP) en hembras caninas con tumores mamarios y relacionar estos valores con la presencia de tumores mamarios malignos.

MATERIAL Y MÉTODOS

SELECCIÓN DE ANIMALES

Se utilizaron 30 hembras caninas de la ciudad de Santiago que concurren al Hospital Clínico Veterinario

Aceptado: 26.08.2009.

* Av Ejército 146, Santiago, Chile; crios@ust.cl

de la Universidad Santo Tomás. Las hembras seleccionadas fueron de edades entre 6 y 15 años, sin discriminación de raza y con peso entre 5 a 35 kg. Estas fueron separadas en tres grupos de 10 animales cada uno: Grupo 1 = clínicamente sanas; Grupo 2 = con neoplasia mamaria benigna; Grupo 3 = con neoplasia mamaria maligna. Sólo se incluyeron hembras caninas no esterilizadas o aquellas que fueron esterilizadas con posterioridad a los dos años y medio de edad, ya que a partir de esta edad se pierde el efecto protector de la ovariectomía en la aparición de neoplasia mamaria (Kitchell 1999).

Para corroborar el estado de salud de los animales se les realizó un examen clínico completo, además de un hemograma y un panel bioquímico básico, no incluyendo animales que presentaran alguna anormalidad en estos exámenes. Además, a las hembras con neoplasias mamarias se les tomó radiografías de tórax de vistas latero-lateral y ventrodorsal con el fin de descartar metástasis pulmonar. Se excluyeron los individuos que presentaron neoplasias ulceradas. Las hembras con neoplasias fueron sometidas a cirugía para la extirpación de los tumores utilizando las técnicas quirúrgicas de rutina.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

De cada animal se obtuvo una muestra de sangre mediante venopunción yugular utilizando tubos con EDTA y sin anticoagulante para la realización de hemograma y perfil bioquímico respectivamente. El suero fue separado mediante centrifugación y dividido en dos alícuotas para la determinación de CRP y perfil bioquímico. Las masas neoplásicas fueron extraídas en su totalidad y se determinó su largo, ancho y alto utilizando pie de metro. En caso de masas de aspecto homogéneo, se obtuvieron dos a tres trozos de un cm de espesor; en caso de masas de aspecto heterogéneo, se obtuvo un trozo de un cm de espesor de cada una de las diferentes zonas observadas. Los tejidos fueron fijados en formalina al 10%.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre fueron analizadas para hemograma mediante un contador hematológico automático (Medonic®, modelo CA 530) y el recuento diferencial mediante frotis sanguíneo teñido con Giemsa. Las muestras para el panel bioquímico básico se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos (Centrifuga Hermle® Z 300) para la obtención del suero. Parte de este suero se procesó en un espectrofotómetro semiautomático (Merck® Microlab 200) para las determinaciones de ALT (E.C 2.6.1.2; U/L), creatinina ($\mu\text{mol/L}$) y urea (mmol/L). La proteína C-reactiva (mg/L) se determinó mediante método inmunoturbidimétrico utilizando un reactivo comercial de uso humano, Turbo PCR- Proteína C-reactiva (LRG®), en un equipo autoanalizador Vitalab Selectra E (Wienerlab®). Este ensayo es de carácter

cuantitativo y se basa en la medida de la inmunoprecipitación en fase líquida.

Los cortes histológicos fueron procesados con técnicas de rutina, teñidos con hematoxilina-eosina y analizados mediante microscopía óptica. Las neoplasias fueron diagnosticadas y tipificadas en malignas o benignas de acuerdo a los criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005).¹

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los valores de CRP obtenidos para cada grupo fueron descritos mediante media, desviación estándar, mediana, rangos y cuartiles (Q1 y Q3). La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La diferencia entre los grupos de animales (sanos, neoplasia benigna y neoplasia maligna) se estableció mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una significancia de un 5%. Mediante un análisis discriminante, se estableció una clasificación del tipo de tumor de acuerdo al nivel de CRP de cada individuo. Se utilizó el paquete estadístico SAS/STAT (1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS MAMARIAS

Las neoplasias encontradas correspondieron a adenoma tubular, tumor mixto benigno y fibroadenoma de baja celularidad para el caso de los tumores benignos. Los malignos correspondieron a adenocarcinoma simple, adenocarcinoma complejo y fibrosarcoma (cuadro 1). Un 40% de todas las neoplasias incluidas en el estudio correspondió a tumor mixto benigno. Esto no difiere mayormente de lo encontrado por otros autores nacionales quienes describen una frecuencia de un 33,3% en este

Cuadro 1. Clasificación histológica de tumores mamarios caninos encontrados según frecuencia.

Frequency for histological classification of canine mammary tumours.

Grupo	Tipo histológico	n	%
Neoplasias benignas	Adenoma tubular	1	5
	Tumor mixto benigno	8	40
	Fibroadenoma de baja celularidad	1	5
Neoplasias malignas	Adenocarcinoma simple	6	30
	Adenocarcinoma complejo	2	10
	Fibrosarcoma	2	10
Total		20	100

¹ WHO/World Health Organization. Histological Classification of Mammary Tumors of the dog and cat [en línea]. Washington, DC., 14 de abril 2005 [fecha de consulta: 22 septiembre 2005]. Disponible en: <http://www.afip.org/vetpath/who/whomamm.html>

tipo de tumor (Flores y Cattaneo 2001). En el grupo de las neoplasias mamarias malignas se observó una mayor presentación del tipo adenocarcinoma (incluyendo los subtipos simple y complejo), representando un 40% de ellas. Flores y Cattaneo (2001) describen un 17,6% de este tipo de tumores, diferencias que pueden ser atribuibles al número de animales y a los criterios de exclusión utilizados en el presente estudio.

VALORES DE PROTEÍNA C-REACTIVA

Los valores promedio de CRP de los grupos estudiados fluctuaron entre 2,2 mg/L y 17,1 mg/L (cuadro 2). Los valores séricos de proteína C-reactiva para el Grupo 1 (2,2 - 4,4 mg/L) coinciden con lo señalado por diversos autores como Caspi y col (1987), Yamashita y col (1994), López y col (1998), Martínez-Subiela y col (2004) y Goldsack (2005), quienes describen valores de hasta 7 mg/L en animales sanos.

Los valores séricos de CRP para el Grupo 2 (2,4-7 mg/L) y Grupo 3 (2,4-17,1 mg/L) fueron menores que los citados por Tecles y col (2005), los que obtuvieron un rango de 3,8-90,52 mg/L en caninos con cáncer. Sin embargo, el estudio mencionado incluyó neoplasias epiteliales, mesenquimáticas y mixtas (no solamente mamarias) y no se hace referencia a si éstas presentaban o no metástasis. Merlo y col (2007) describen valores de CRP en caninos con linfoma multicéntrico entre 40 y 100 mg/L y Kjelgaard-Hansen y col (2003^a) valores de entre 1,1 a 91,9 mg/L (media 5,0 mg/L) en perros con neoplasias benignas y malignas.

COMPARACIÓN DE PROTEÍNA C-REACTIVA ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS

No se observaron diferencias significativas en los niveles de CRP entre el Grupo 1 y el Grupo 2 ($P > 0,05$). Esto se puede deber a que las células neoplásicas benignas son bien diferenciadas, similares a las células normales de la glándula mamaria (Moulton 1990), lo que no generaría estímulo inflamatorio. Las hembras del Grupo 3 presentaron un promedio de CRP más alto que las de los Grupos 1 y 2 ($P = 0,03$), lo que concuerda con los resultados de Planellas y col (2007) quienes encontraron en perras con carcinoma

mamario un aumento significativo de CRP en comparación con perras normales. Este aumento se puede atribuir a que las neoplasias malignas pueden estar asociadas con una respuesta de fase aguda en ausencia de cualquier otra causa obvia inflamatoria (Tecles y col 2005). Por lo tanto, el incremento en CRP detectado en este estudio puede ser explicado como una respuesta sistémica a esta inflamación, situación que pareciera estar asociada con cambios neoplásicos malignos tempranos (Lithgow y Covington 2005). La inflamación crónica favorece la selección de características adicionales de células iniciadas (por eventos iniciadores de carcinogénesis) que podrían promover su transición completa hacia la malignidad ("promoción") (DeNardo y Coussens 2007). Uno de los factores involucrados en esta respuesta inflamatoria es la antigenicidad neoplásica. Ésta se describe sólo en aquellas neoplasias de carácter maligno porque estas células sufren cambios en la expresión de moléculas de membrana celular, lo que propicia que se induzcan respuestas inmunológicas contra ellas (Batista 2003). El incremento del infiltrado leucocitario del estroma neoplásico aumenta en paralelo con la carcinogénesis mamaria y la activación crónica de linfocitos B podría, en forma paradójica, potenciar el desarrollo del carcinoma (DeNardo y Coussens, 2007). A su vez, los macrófagos actúan ante la presencia de células neoplásicas con la producción del factor de necrosis tumoral, que es una de las citoquinas estimuladoras de producción de proteínas de fase aguda hepática (Batista 2003). En cáncer existe una constante muerte celular, como consecuencia del recambio celular o como resultado de la isquemia en tumores de crecimiento rápido, lo que induce una respuesta de fase aguda. Asimismo, los tejidos adyacentes pueden resultar dañados como consecuencia de una expansión volumétrica del tumor, lo que podría explicar los valores más bajos de CRP obtenidos en este estudio en comparación con perros con otros tipos de cáncer como es el caso del linfoma multicéntrico (Merlo 2007).

El aumento de los valores de CRP del Grupo 3 en comparación con el Grupo 1 fue de 2 a 3 veces su valor (2-3X). Esto es menor a lo reportado con otras causas inflamatorias como trauma quirúrgico (95X) (Conner 1988) o la infección natural con parvovirus (20X) o leptospira (30X) (Yamamoto y col 1993) y similar a lo reportado en infección por *Ehrlichia canis* (3,3-6,5X) (Rikihisa y col 1994).

Cuadro 2. Media, desviación estándar, mediana, rango y cuartiles de CRP (mg/L) para los tres grupos de caninos estudiados.

Mean, standard deviation, median, range and quartiles of CRP (mg/L) for all canine groups studied.

Grupo	N	Media ± D. E	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
Control	10	3,37 ± 0,68	3,45 ^{b*}	2,2	4,4	2,8	3,9
Neoplasia benigna	10	4,29 ± 1,54	3,6 ^b	2,4	7	3,2	5,8
Neoplasia maligna	10	8,20 ± 5,21	7,15 ^a	2,4	17,1	3,6	12,4

* Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).
Different letters within the same column differ significantly ($P < 0,05$).

Lo anterior podría explicarse porque las inflamaciones crónicas generan un menor incremento de proteínas de fase aguda que episodios agudos de inflamación o infección (Cerón y col 2005).

El rango de CRP encontrado en el Grupo 3 (2,4-17,1 mg/L) se podría explicar por los distintos estadios en que se encontraban las neoplasias, lo que implicaría distintos grados de respuesta inflamatoria. Aumentos significativos de CRP se han descrito en tumores mamarios con metástasis o diámetro mayor a 5 cm (Tecles y col 2009). Lo anterior no fue corroborado, puesto que la estadificación según TNM (UICC, 2009)² de las neoplasias se encontraba más allá de los objetivos de este estudio.

CLASIFICACIÓN DE TIPO DE TUMOR DE ACUERDO AL NIVEL DE PROTEÍNA C.

Al analizar los valores de CRP en los grupos 2 y 3 se verifica que en el Grupo 2 el valor mínimo fue de 2,4 mg/L y el máximo de 7,0 mg/L, mientras que en el 3 estos corresponden a 2,4 y 17,1 mg/L respectivamente. Lo anterior lleva a establecer que 7 mg/L podría ser un valor de corte posible, ya que ninguno de los benignos supera dicho valor, mientras que el 50% de los malignos tienen valores superiores (figura 1). Para corroborar lo anterior se realizó un análisis discriminante para ambos grupos. Esta función dio como resultado que el 80% de los casos del Grupo 2 fueron correctamente clasificados, mientras que para el Grupo 3 este valor alcanzó a un 50%, debido a que hay casos de tumores que a pesar de ser malignos presentaron valores bajos. Utilizando la función discriminante se determinó que un individuo con valor de CRP ≥ 7 mg/L sería clasificado como maligno con una probabilidad del 55% o más, mientras que en un individuo con un valor ≥ 8 mg/L esta probabilidad aumenta a un 61% o más.

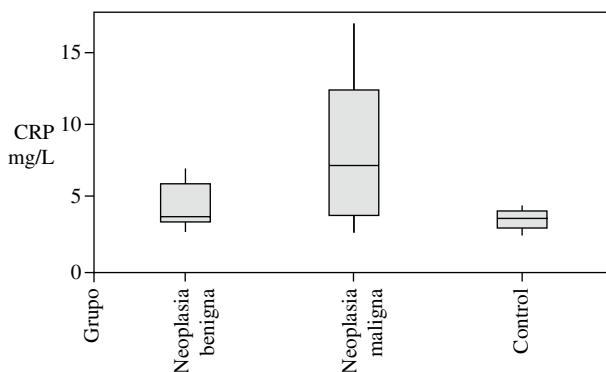


Figura 1. Distribución de los valores de CRP (mg/L) en los tres grupos de caninos estudiados.

Distribution of CRP (mg/L) values of the three canine groups studied.

² UICC/International Union against cancer. TNM classification of malignant tumours [en línea]. Fecha de consulta: 4 de mayo 2009. Disponible en: <http://www.uicc.org/tnm>

De acuerdo con los resultados de este estudio, la medición de CRP podría ser una herramienta útil en el monitoreo de neoplasias mamarias caninas. Estudios adicionales con un mayor número de animales serían necesarios para definir de mejor forma el uso clínico de esta determinación.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar los niveles séricos de proteína C-reactiva en caninos con neoplasias mamarias benignas y malignas. Se determinaron concentraciones séricas de proteína C-reactiva en 30 hembras caninas con edades entre 6 y 15 años, sin discriminación de raza y no esterilizadas. Los animales fueron divididos en tres grupos de 10 individuos cada uno: grupo 1 (control), grupo 2 (neoplasia mamaria benigna) y grupo 3 (neoplasia mamaria maligna). Las neoplasias mamarias fueron clasificadas mediante estudio histopatológico en benignas o malignas. Los niveles séricos de proteína C-reactiva se determinaron a partir de un ensayo inmunoturbidimétrico de uso humano validado en caninos. El grupo 3 fue el que presentó los valores más altos (media 8,2 mg/L, mediana 7,1 mg/L) de proteína C-reactiva con respecto a los otros dos grupos ($P < 0,05$). De acuerdo con un análisis discriminante, una perra con neoplasia mamaria y valores de CRP ≥ 8 mg/L tiene una probabilidad de un 61% o más de que ésta sea maligna.

REFERENCIAS

- Allin K, S Bojesen, B Nordestgaard. 2009. Baseline C-reactive protein is associated with incident cancer and survival in patients with cancer. *J Clin Oncol* 27, 2217-2224.
- Aziz N, J Fahey, R Detels, A Butch. 2003. Analytical performance of a highly sensitive c-reactive protein-based immunoassay and the effects of laboratory variables on levels of protein in blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 652-657.
- Batista A. 2003. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *MEDISAN* 7, 75-88.
- Caspi D, FW Snel, E Gruys, D Niv, RM Batt, EA Munn, N Buttress, MB Pepys. 1984. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology* 53, 307-313.
- Caspi D, FW Snel, RM Batt, D Bennett, GR Rutteman, EG Hartman, ML Baltz, E Gruys, MB Pepys. 1987. C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res* 48, 919-21.
- Cerón J, D Eckersall, S Martínez-Subiela. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 34, 85-99.
- Conner JG, PD Eckersall, J Ferguson, TA Douglas. 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res Vet Sci* 45, 107-110.
- DeNardo DG, LM Coussens. 2007. Balancing immune response: cross-talk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9, 212-222.
- Egenvall A, BN Bonnett, P Ohagen, P Olson, A Hedhammar, H von Euler. 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, 109-127.
- Flores E, G Cattaneo. 2001. Tumores mamarios en caninos domésticos, epidemiología, criterios de diagnóstico y enfoque terapéutico. *Mon de Med Vet* 21, 1-16.
- Goldsack A. 2005. Determinación de proteína c-reactiva pre y post quirúrgica en hembras caninas sometidas a ovariectomía. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile.
- Hayashi S, T Jinbo, M Iguchi, M Shimizu, T Shimada, M Nomura, Y Ishida, S Yamamoto. 2001. A comparison of the concentrations of C-Reactive protein and α 1- acid glycoprotein in the serum of

- young and adult dogs with acute inflammation. *Vet Res Commun* 25, 117-126.
- Itoh T, K Uchida, K Ishikawa, K Kushima, E Kushima, H Tamada, T Moritake, H Nakao, H Shii. 2005. Clinicopathological Survey of 101 Canine Mammary Gland Tumors: Differences between Small-Breed Dogs and Others. *J Vet Med Sci* 67, 345-347.
- Kitchell B. 1999. Tumores mamarios. En: Kirk R, Bonagura J (eds). *Kirk: Terapéutica veterinaria de pequeños animales*. 12ª ed. MacGraw-Hill Interamericana, México, Pp 1181-1187.
- Kjelgaard-Hansen M, AL Jensen, A Kristensen. 2003^a. Evaluation of a commercially available human C reactive protein (CRP) turbidimetric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol* 32, 81-87.
- Kjelgaard-Hansen M, AT Kristensen, AL Jensen. 2003^b. Evaluation of a commercially available enzyme immunoabsorbent assay (ELISA) for the determination of C-Reactive protein in canine serum. *J Vet Med Assoc* 50, 164-168.
- Knapp D, D Waters, B Schmidt. 2002. Tumores de las glándulas mamarias. En: Ettinger J, Feldman E (eds). *Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del Perro y del Gato*. 5ª ed. Editorial Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina, Pp 606-607.
- Lithgow D, C Covington. 2005. Chronic inflammation and breast pathology: A theoretical model. *Biol Res Nurs* 7, 118-129.
- López J, A Islas, V Merino, G Mora, A Muñoz, R García. 1998. Efecto de estímulos inflamatorios locales y sistémicos en la proteína C-reactiva, fibrinógeno y leucograma de caninos. *Agro-Ciencia* 14, 121-126.
- Madewell B. 1997. Tumor Markers. In: Kaneko J, Harvey J, Bruss M (eds). *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 5th ed. Academic Press, California, USA, Pp 761-784.
- Madewell B. 2003. Cytodiagnosis of cancer - images from specialists in oncology. In: *21st Annual ACVIM Forum Proceedings*. Session 269/270. Charlotte, North Carolina, USA.
- Martínez-Subiela S, P Ginel, J Cerón. 2004. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec* 154, 814-817.
- Martínez-Subiela S, J Cerón. 2005. Validación analítica de técnicas comerciales para la determinación de haptoglobina, proteína C-reactiva y amiloide sérico A en caninos. *Arch Med Vet* 37, 61-66.
- Merlo A, BC Gagliano, ML Franchini, DM Nunes, SR Ricci. 2007. Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. *J Am Vet Med Assoc* 230, 522-526.
- Moulton J. 1990. Tumors of the Mammary Gland. In: *Tumors in Domestic Animals*. 3rd ed. University of California Press, Los Angeles, California, USA, Pp 518-552.
- Petersen H, J Nielsen, P Heegaard. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35, 163-187.
- Planellas M, Y Sacco, M Gimenez, R Pato, A Bassols, C Siracusa, J Pastor. 2007. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in mammary tumors of the dog (ESVCP Annual Meeting Abstracts). *Vet Clin Pathol* 36, 385.
- Rikihisa Y, S Yamamoto, I Kwak, Z Iqbal, G Kociba, J Mott, W Chichanasiriwithaya. 1994. C-reactive protein and alpha-1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Micro* 32, 912-917.
- S.A.S./STAT. 1985. *Statistical Analysis System*. Guide personal computer 6th ed. Minnesota, USA.
- Tecles F, E Spiraneli, U Bonfanti, J Cerón, S Paltrinieri. 2005. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J Vet Intern Med* 19, 865-870.
- Tecles F, M Caldín, A Zanella, F Membiela, A Tvarijonavičute, S Martínez Subiela, J Cerón. 2009. Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 21, 214-219.
- Yamamoto S, T Shida, H Miyaji, H Santsuka, H Fujise, K Mukawa, E Furukawa, T Nagae, M Naiki. 1993. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Commun* 17, 85-93.
- Yamashita K, T Fujinaga, T Miyamoto, M Hagio, Y Izumisawa, T Kotani. 1994. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci* 56, 487-492.
- Zhang S, J Lin, N Cook, I Lee, J Manson, J Buring, P Ridker. 2007. C-reactive protein and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 99, 890-894.