

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**VALIDACIÓN DE TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE BROMURO EN SUERO CANINO**

por

**Br. María Victoria BENTANCUR
Br. Diego ROBAINA**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria; Higiene,
Inspección-Control y Tecnología de los
Alimentos de origen animal**

MODALIDAD: Trabajo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

Dra. Silvana Alvariza

Segundo miembro:

Dr. Gonzalo Suarez

Tercer miembro:

Dr. Pedro Martino

Cuarto miembro:

Dra. Gimena Feijóo

Fecha:

Autores:

Br. María Victoria Bentancur

Br. Diego Robaina

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor, Dr. Gonzalo Suarez, y la co-tutora Dra. Gimena Feijóo, por su contribución en nuestra formación profesional, por acompañarnos, guiarnos y motivarnos durante este proceso, haciendo posible la conclusión de esta etapa.

A nuestras familias por los valores transmitidos y el apoyo durante tantos años de carrera.

A nuestros amigos, que siempre estuvieron presentes.

Diego Robaina agradece especialmente a Eliana Fernández, compañera de vida, por siempre estar.

Victoria Bentancur agradece especialmente a Damián Molina, por el apoyo incondicional.

A los compañeros del Área Farmacología, en especial a Vernadet Bianchinotti (PeCo) por su colaboración durante el ensayo.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica, en especial al Dr. Juan Pablo Damián.

A los propietarios de las mascotas que participaron en este ensayo.

Al personal del Hospital de Facultad de Veterinaria.

Al personal de Biblioteca, Hemeroteca y Referencias.

A la Universidad de la República.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Epilepsia	9
Fisiopatología	10
Diagnóstico	11
Terapéutica	12
Cuando comenzar un tratamiento a largo plazo con FAE	13
Elección del FAE	13
Fenobarbital	15
Bromuro	16
Monitoreo terapéutico	19
Validación de un procedimiento analítico	20
OBJETIVO	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Diseño experimental	23
Validación del método	25
Monitoreo de casos clínicos	26
Análisis estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1. Estructura de trabajo diaria empleada en la validación de la técnica espectrofotométrica para la determinación de Bromuro en suero canino.....	24
Tabla 2. Análisis de regresión lineal para la cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino para 3 días de trabajo.....	28
Tabla 3. Exactitud y Repetibilidad Intra-día por nivel y global obtenidas en los 3 días de trabajo para la validación de una técnica de cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino.....	29
Tabla 4. Exactitud y Precisión Intermedia (Inter-día) por nivel y global obtenidas para la validación de una técnica de cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino.....	29
Tabla 5. Límite de Detección y Límite de Cuantificación obtenidos en los 3 días de trabajo para la validación de una técnica de cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino.....	30
Tabla 6. Monitoreo al Día 0 y Día 60 de las concentraciones séricas de Bromuro en 5 pacientes caninos medicados con Bromuro de Potasio.....	31
Figura 1. Representación de los mecanismos de acción de diferentes FAE.....	14
Figura 2. Reabsorción tubular en la nefrona.....	17
Figura 3. Representación gráfica de los parámetros Precisión y Exactitud.....	21
Figura 4. Gráficos de Absorbancia en función de la Concentración de Bromuro ([Br-]) cuantificada en suero canino en 3 días de trabajo.....	27
Figura 5. Concentraciones de Bromuro sérico cuantificadas en 5 pacientes caninos en tratamiento antiepiléptico con Bromuro de Potasio (KBr).....	32

RESUMEN

En la presente tesis se llevó a cabo la validación de la metodología analítica para la cuantificación de la concentración de Bromuro en suero canino mediante el uso de una técnica espectrofotométrica. La validación se realizó utilizando como matriz el suero de 6 caninos de compañía, clínicamente sanos, que no hubieran sido medicados con Bromuro de Potasio u otra droga en los últimos 6 meses. El ensayo se realizó empleando concentraciones de 0, 150, 250, 500, 1000, 2000, 3000 y 4000 $\mu\text{g/mL}$ de Bromuro, con repetición de la metodología durante 3 días consecutivos. El método analítico fue evaluado en función de los parámetros Linealidad, Exactitud, Precisión, Límite de Detección, Límite de Cuantificación y Recuperación Absoluta. Se comprobó la Linealidad para el rango de 150 a 3000 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 > 0,99$). Para la totalidad del ensayo los valores de Exactitud y Precisión fueron de 97,3 % y 6,6 %, respectivamente, cumpliendo los criterios de aceptación establecidos. El Límite de Detección calculado fue de 96 $\mu\text{g/mL}$ y el Límite de Cuantificación de 150 $\mu\text{g/mL}$ de Bromuro. La Recuperación Absoluta del ensayo fue de 98,4 %. Los valores obtenidos para los diferentes parámetros analizados validan la técnica para el rango de concentraciones de 150 $\mu\text{g/mL}$ a 3000 $\mu\text{g/mL}$, en las condiciones de trabajo utilizadas. Los resultados obtenidos mediante la puesta en práctica de la técnica en pacientes medicados con Bromuro de Potasio avalan y dan respaldo a la validación realizada.

SUMMARY

The validation of an analytical method to quantify the concentration of bromide in canine serum using a spectrophotometric technique was carried out in this study. Serum from 6 clinically healthy companion dogs, which have not been treated with Potassium Bromide or any other drugs for the last 6 months was used as matrix. The test was performed using concentrations of 0, 150, 250, 500, 1000, 2000, 3000 and 4000 µg/mL of bromide, with the methodology carried out during 3 consecutive days. The analytical method was evaluated according to the parameters Linearity, Accuracy, Precision, Limit of Detection, Limit of Quantification and Absolute Recovery. Linearity was borne out for the range 150-3000 µg/mL ($R^2 > 0.99$). The global Accuracy and Precision values were 97.3% and 6.6%, respectively, meeting the acceptance criteria. A Limit of Detection of 96 µg/mL and a Limit of Quantification of 150 µg/mL for Bromide was calculated. The Absolute Recovery of the assay was 98.4 %. The values obtained for the different analyzed parameters validate the technique for the concentration range of 150 µg/mL to 3000 µg/mL in the conditions used in this study. The results obtained through the implementation of the technique in patients treated with Potassium Bromide supports the performed validation.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad cerebral compleja y heterogénea en la que, debido a la actividad repentina y anormal de las vías neurales, se desarrollan una gran variedad de signos clínicos neurológicos que pueden devenir en graves consecuencias para el paciente. (Berendt y col., 2015; Podell y col., 2016). Los caninos con epilepsia se encuentran dentro de los pacientes neurológicos más comunes en la práctica veterinaria (Berendt y col., 2015), por lo que la comunidad científica ha realizado un gran esfuerzo para intentar llegar a un consenso en cuanto a la terminología, clasificación, aproximación diagnóstica, tratamiento y monitoreo de la enfermedad y los pacientes que la padecen.

La administración de Fármacos Antiepilépticos es el principal pilar en el tratamiento de la epilepsia idiopática; para el caso de la epilepsia estructural, el uso de estos fármacos siempre se realiza conjuntamente al tratamiento de la causa, si esto último es posible. La meta de la terapia con fármacos antiepilépticos es disminuir la frecuencia, duración, severidad y número total de crisis que suceden en un periodo de tiempo determinado, con efectos adversos limitados o aceptables para maximizar tanto la calidad de vida del paciente como del propietario (Bhatti y col., 2015).

El Bromuro es un haluro inorgánico con propiedades sedantes y anticonvulsivantes, usualmente administrado en forma de Bromuro de Potasio (Bhatti y col., 2015). Aunque éste fue utilizado tradicionalmente en combinación con Fenobarbital, en la actualidad se prescribe cada vez más como único agente farmacológico para el control de las crisis convulsivas (Trepanier, 1995; Thomas, 2010). La dosis recomendada para iniciar el tratamiento con Bromuro de Potasio como monodroga es de 20 mg/kg cada 12 horas vía oral, y cuando es utilizado en combinación con Fenobarbital, la dosis indicada es de 15 mg/kg cada 12 horas. Los rangos terapéuticos séricos reportados para el Bromuro son de aproximadamente 2000 – 3000 µg/mL, cuando se utiliza en monoterapia, y de 1000 – 2000 µg/mL cuando se administra junto con Fenobarbital (Trepanier y col., 1998).

El monitoreo terapéutico es la cuantificación de la concentración de una droga en un tejido específico para evaluar si un paciente en particular presenta concentraciones subterapéuticas, terapéuticas o tóxicas de esa droga. Para el estudio de las concentraciones de Bromuro en suero canino, se utiliza un método de laboratorio basado en espectrofotometría que debe ser validado previo a su empleo rutinario. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es documentar que el mismo es apto para el propósito indicado, de manera que se obtenga un método confiable y reproducible (ICH, 2005).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Epilepsia

Las crisis epilépticas son un desorden neurológico común en caninos caracterizadas por un amplio espectro de signos clínicos neurológicos y sus consecuencias (Podell y col., 2016). La prevalencia real de epilepsia en caninos es desconocida, pero se estima que se encuentra entre 0,6-0,75 % en la población canina general (Berendt y col., 2015). En la Unidad de Neurología del Hospital de Facultad de Veterinaria (UdelaR), la frecuencia de convulsiones entre los años 2005 y 2010 fluctuó desde 7% a 23% de la consulta neurológica y de 0,4 % a 2 % de la consulta general del Hospital (Feijóo y col., 2011). La recurrencia de episodios epilépticos puede devenir en alteraciones irreversibles a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), pudiendo aparecer déficits neuropatológicos persistentes, que generen detrimento en la calidad de vida del paciente (Podell, 2008).

Acerca de la epilepsia y los síndromes convulsivos existen muchos puntos de vista y una notable confusión en cuanto a la terminología y clasificación, sobre todo en Medicina Veterinaria. En Medicina Humana existen distintas clasificaciones de los ataques epilépticos, según la forma clínica, etiología, frecuencia, edad de aparición, cambios electroencefalográficos y área de origen de los ataques (Engel, 2001). Utilizar el mismo tipo de clasificación en Medicina Veterinaria resulta complicado ya que en animales no se han identificado todos los tipos de crisis que aparecen en humanos, y es imposible demostrar clínicamente en los animales las múltiples situaciones que se aprecian en Medicina Humana (sensaciones anormales de tipo visual, auditivo o gustativo, malestar, palidez, sudoración, alucinaciones, entre otras) (Lorenzo y Bernardini, 2007; Morales y Montoliu, 2012). Además, la forma clínica del ataque en caninos y felinos debe determinarse en la mayoría de las ocasiones a partir de la descripción del propietario, que puede ser vaga y confusa.

La epilepsia es una enfermedad compleja del cerebro donde ocurre una actividad anormal y repentina de las vías neuronales. Las neuronas de la corteza cerebral y de otras áreas subcorticales pueden estar sujetas a una actividad paroxística imprevista, excesiva, desordenada, sin propósito y generalmente autolimitante, que induce una gran variedad de manifestaciones clínicas según la extensión y localización del área cerebral interesada por el fenómeno. Es la propia diversidad de presentaciones clínicas la que hace difícil la identificación de un término que pueda ser utilizado para definir todo el complejo, independientemente de la sintomatología. En Medicina Veterinaria el término más empleado para definir estos acontecimientos es el de convulsión o crisis convulsiva. La limitante de este término radica en que normalmente es utilizado en referencia a crisis motoras generalizadas pero no es adecuado

para la descripción de fenómenos sensoriales, de comportamiento o focales. Debido a esto, diferentes autores aconsejan, al igual que en Medicina Humana, el empleo de términos más amplios como crisis o ataques (Lorenzo y Bernardini, 2007), los cuales serían definidos como eventos de corta duración, transitorios, no específicos y paroxísticos del organismo (Engel, 1989; Berendt y col., 2015). También puede adoptarse el término de crisis epiléptica, la cual es la manifestación clínica de una actividad neuronal anormal excesiva y/o hipsincrónica de la corteza cerebral (Podell, 1996; Berendt y col., 2015). Es importante señalar que los términos crisis, ataque, convulsión, crisis convulsiva, crisis epiléptica y ataque epiléptico, no especifican la etiología subyacente del proceso, y si bien existen pequeñas diferencias en su definición académica, los mismos serán empleados a lo largo del presente trabajo como sinónimos.

Fisiopatología

La epilepsia representa una enfermedad heterogénea que puede deberse a diferentes etiologías, patrones de crisis electrofisiológicos y de comportamiento, y respuestas a intervenciones farmacológicas. Como tal, la patogenia de la epilepsia es multifactorial. Independientemente de la causa, los ataques epilépticos de un paciente pueden repetirse en el tiempo o pueden ocurrir como un suceso aislado. Si el paciente sufre de un proceso encefálico crónico caracterizado por crisis convulsivas recurrentes, ese paciente sufre epilepsia (Podell, 2008; Berendt y col., 2015).

Cualquier animal es susceptible de sufrir ataques epilépticos en determinadas circunstancias; el padecerlos es el resultado de interacciones complejas de múltiples factores (Knowles, 1998). La facilidad con que se pueden inducir ataques varía entre animales. Existen factores de susceptibilidad genéticos que provocan que un individuo sufra ataques epilépticos como respuesta a ciertos acontecimientos desencadenantes, lo que se conoce como el umbral de crisis (Podell, 2008; Morales y Montoliu, 2012).

Un principio básico del mecanismo de la epilepsia es la presencia de un desequilibrio entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio principal del encéfalo, y juega un papel importante en la modulación de funciones cognitivas, motoras, de memoria y sensoriales del SNC. En contraposición, el ácido γ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia del encéfalo. Frente a la situación de un exceso de excitación o una pérdida de inhibición se desencadenará la despolarización de las neuronas sin los mecanismos de regulación de *feedback* normales. El resultado es un cambio a la despolarización paroxística de un conjunto de neuronas, produciendo la denominada descarga epiléptica. La zona del encéfalo en la cual se desarrolla esta actividad se denomina foco epileptogénico. En respuesta al cambio repentino de actividad neuronal, se establecen zonas de inhibición locales circundantes para intentar prevenir la extensión del foco. Si éste es de dimensiones reducidas, o el mecanismo de inhibición funciona correctamente, no se presentan crisis. Cualquier alteración del equilibrio excitación-inhibición puede aumentar la actividad neuronal del

foco y disminuir la actividad de las neuronas GABAérgicas, lo que permitiría la difusión de la descarga, dando lugar a un ataque epiléptico (Lorenzo y Bernardini, 2007; Podell, 2008).

Además del desequilibrio entre excitación e inhibición, intervienen en la patogénesis muchos otros factores, que incluyen: formación de circuitos excitadores, alteraciones en receptores y en canales iónicos, y disfunción de células gliales (Chang y Lowenstein 2003; Cabo-de la Vega y col., 2006). Se han relacionado mutaciones de canales iónicos con una variedad de epilepsias consideradas idiopáticas en humanos. La mayoría de genes identificados hasta ahora relacionados con epilepsia idiopática, son mutaciones genéticas hereditarias de canales iónicos, llamadas canalopatías (Noebels, 2003). El influjo excesivo de sodio, el bloqueo del eflujo de potasio o las alteraciones en el flujo del calcio pueden conducir a descargas neuronales repetitivas. En muy pocas razas caninas se han podido identificar mutaciones en genes específicos como causa de epilepsia, aunque es probable que en un futuro próximo el número de razas en las que se hallen este tipo de alteraciones aumente (Podell, 2008; Morales y Montoliu, 2012).

En las fases iniciales de la enfermedad, un animal puede poseer un único o un número limitado de focos epilépticos. Con actividad epiléptica recurrente, incrementará el número de células con un patrón intrínseco de descarga espontánea elevada ("células marcapasos") en el foco epiléptico. El incremento del número de células marcapasos está altamente correlacionado con un aumento en la frecuencia de las crisis en modelos experimentales de epilepsia (Wyler y col., 1978). Además, puede desarrollarse un foco espejo de neuronas epileptogénicas en una región homóloga del hemisferio contralateral. Por lo tanto, si el paciente continúa sufriendo ataques, incrementará el número de áreas del encéfalo que pueden iniciar una crisis de forma aleatoria y espontánea, lo cual compromete el éxito del tratamiento médico. La prevención de esta secuencia depende principalmente de la identificación rápida de la etiología subyacente de la epilepsia, seguido de un tratamiento médico apropiado (Podell, 2008).

Diagnóstico

Frente a un paciente que ha sufrido una o más crisis epilépticas, se debe prestar atención a la reseña, anamnesis, examen físico general y neurológico, para obtener información inicial sobre las posibles causas (Morales y Montoliu, 2012).

Existen distintas pruebas diagnósticas de utilidad frente a un paciente con crisis convulsivas. Basándose en la anamnesis y la presentación clínica, se determina cuáles de estas pruebas son pertinentes para cada paciente:

- Estudios Paraclínicos: hemograma, perfil bioquímico, glicemia, urianálisis, medición de la presión sanguínea, funcional hepático y estudio de ácidos biliares, y la determinación de hormonas tiroideas

(TSH y T4). Estos análisis permiten detectar posibles enfermedades sistémicas que cursan con cuadros convulsivos, y además descartar procesos concomitantes, así como determinar si existen alteraciones que puedan contraindicar la administración de determinados fármacos anticonvulsivantes;

-Estudios toxicológicos y parasitológicos: pruebas individuales para descartar exposición a toxinas o infecciones de causa parasitaria;

-Estudios de imagen: técnicas de imagen avanzada del encéfalo, resonancia magnética o tomografía axial computarizada. Estas pruebas permiten descartar o confirmar causas intracraneales de ataques epilépticos;

-Análisis del fluido cerebro-espinal: indicado especialmente cuando existe la sospecha de procesos inflamatorios o infecciosos (Podell, 2008; Morales y Montoliu, 2012);

-Electroencefalograma (EEG): la confirmación absoluta de la naturaleza epiléptica de una crisis solo puede obtenerse observando simultáneamente los cambios característicos del EEG y las manifestaciones físicas del ataque. Sin embargo, en la actualidad no existe un protocolo estándar fiable para la adquisición de sus registros en caninos, aunque se espera que adquiera mayor relevancia en el futuro (De Risio y col., 2015).

Terapéutica

La meta de la terapia con fármacos antiepilépticos (FAE) es alcanzar un balance entre la ausencia de convulsiones y la calidad de vida del paciente. La erradicación de las crisis no se alcanza comúnmente en pacientes caninos, por lo que una meta realista sería disminuir la frecuencia, duración, severidad y número total de crisis que suceden en un período de tiempo determinado, con efectos adversos limitados o aceptables para maximizar tanto la calidad de vida del paciente como del propietario (Bhatti y col., 2015).

Según la propuesta consensual de la *International Veterinary Epilepsy Task Force* planteada por Bhatti y col. (2015), la aproximación clínica al tratamiento farmacológico de la epilepsia debería realizarse siguiendo las siguientes pautas:

-Establecer el criterio para iniciar el tratamiento con FAE;

-Seleccionar el FAE más apropiado para cada paciente y la posología;

-Determinar cuándo monitorear las concentraciones séricas del FAE y ajustar el tratamiento en base a los resultados;

- Identificar en qué momento es necesario adicionar o modificar un FAE.

Cuando comenzar un tratamiento a largo plazo con FAE

La decisión de iniciar un tratamiento con un FAE se basa en los siguientes factores: tipo, frecuencia y gravedad de las crisis, y sus consecuencias. Se recomienda instaurar el tratamiento cuando las crisis aparecen más de una vez en 6 meses, en presencia de *status epilepticus* (estado de actividad epiléptica continua que dura 30 minutos o más) o crisis en *cluster* (2 o más ataques en menos de 24 horas). También cuando se presentan signos especialmente severos tras el ataque (agresividad, ceguera), cuando estos duran más de 24 horas, y/o cuando la frecuencia, duración o severidad van en aumento (Bhatti y col., 2015).

Elección del FAE

La elección del FAE se debe realizar estudiando cada caso en particular, para lo cual varios factores deben ser tomados en cuenta:

- Factores específicos del FAE: aspectos regulatorios, margen de seguridad, efectos adversos, presentación comercial, interacciones con otras drogas y posología del mismo;
- Factores relacionados al paciente: tipo de crisis, frecuencia, etiología, enfermedades intercurrentes (problemas renales, hepáticos o gastrointestinales);
- Factores relacionados al propietario: estilo de vida y poder adquisitivo (Bhatti y col., 2015).

Debido a su largo historial de uso, amplia disponibilidad comercial y bajo costo, el Fenobarbital y el Bromuro de Potasio son hace ya mucho tiempo las drogas de elección para el tratamiento de la epilepsia en caninos. Nuevas drogas de uso humano también están comenzando a ser empleadas para el manejo de esta enfermedad en animales domésticos, y aunque han ganado popularidad, los datos científicos sobre su seguridad y eficacia son aún muy limitados (Bhatti y col., 2015).

Según Podell (2008), los FAE pueden clasificarse en 3 amplias categorías en base a su mecanismo de acción:

- Incremento de los procesos inhibitorios por medio de la facilitación de la acción del GABA;
- Reducción de la transmisión excitatoria;

-Modulación de la conductancia de membrana de cationes.

Los FAE más comúnmente utilizados en Medicina Veterinaria pertenecen a la misma categoría de mecanismo de acción, que es la de facilitar los procesos inhibitorios del encéfalo (Podell, 1998). En la Figura 1 se representan los mecanismos de acción de diferentes FAE, destacándose el lugar de acción de los barbitúricos (Fenobarbital) y de las Sales de Bromuro a nivel de la sinapsis inhibitoria, facilitando ambos la acción del GABA.

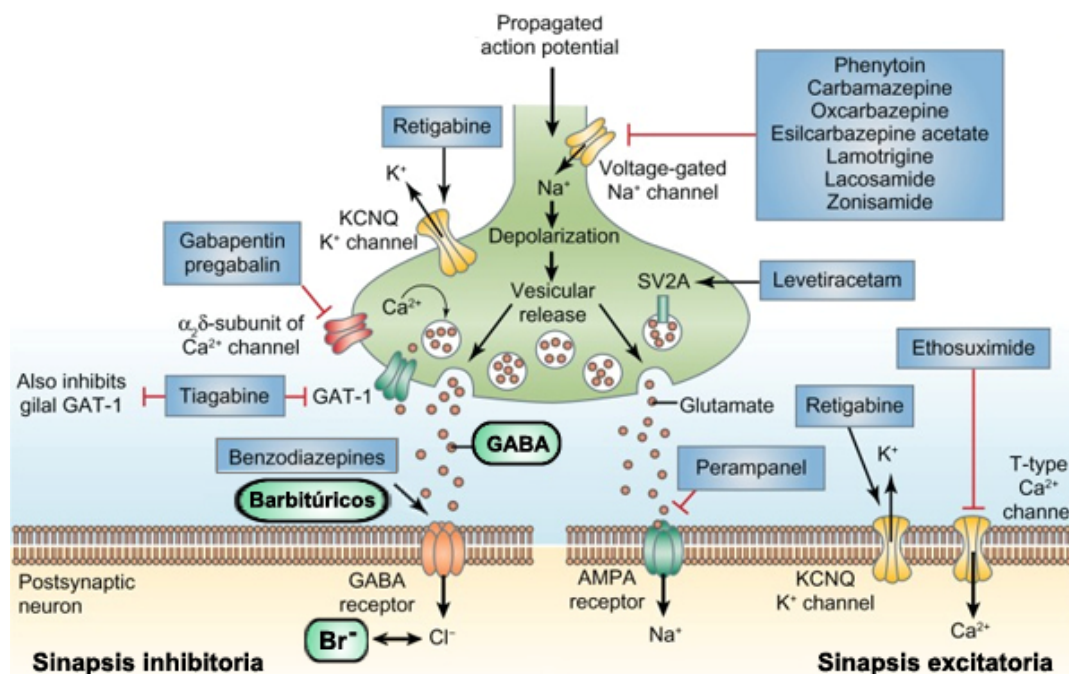


Figura 1. Representación de los mecanismos de acción de diferentes FAE. Se puede observar la variedad de mecanismos de acción existentes tanto en la neurona presináptica como en la postsináptica, ya sea a nivel de procesos inhibitorios o excitatorios. Se destacan la acción de los FAE más utilizados en Medicina Veterinaria, Fenobarbital y Bromuro, los cuales actúan a nivel de la sinapsis inhibitoria facilitando la acción del GABA. Imagen modificada de Shih y col., 2013.

En general, la monoterapia es todavía la recomendación para el tratamiento de la epilepsia en las fases iniciales. La utilización de un único FAE tiene las ventajas de ofrecer ausencia de interacciones con otros fármacos, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas más predecibles y menos probabilidad de efectos adversos. No todos los cuadros epilépticos en animales de compañía pueden controlarse con un único FAE y algunos pacientes requieren medicaciones múltiples para el control de las crisis (Podell, 2008).

Fenobarbital

El Fenobarbital (FB), perteneciente a la familia de los barbitúricos, es el FAE más utilizado de forma crónica en Medicina Veterinaria (Schwartz-Porsche y col., 1985; Podell, 2008). Aunque el FB ha estado disponible por más de 100 años, su mecanismo de acción aún no es comprendido en su totalidad. La mayoría de las acciones farmacológicas de los barbitúricos se asocian a la unión con el complejo de receptores GABA. Esto resulta en una hiperpolarización de la membrana neuronal, la cual se vuelve menos susceptible a la actividad de los neurotransmisores excitatorios (Podell, 1996).

El FB es efectivo en disminuir la frecuencia de las convulsiones en aproximadamente 60-93 % de los caninos con epilepsia idiopática, cuando las concentraciones plasmáticas son mantenidas dentro del rango terapéutico (25 – 35 µg/mL) (Farnbach, 1984; Schwartz-Porsche y col., 1985; Boothe y col., 2012).

La dosis de inicio de FB en caninos es de 2,5 a 3 mg/kg, vía oral cada 12 horas (Podell, 2008; Bhatti y col., 2015). Tras su administración por esta vía presenta una biodisponibilidad de aproximadamente 90 %, alcanzando su concentración plasmática máxima en 4-8 horas luego de su administración (Al-Tahan y Frey, 1985; Ravis y col., 1989) y presentando una vida media o semivida de eliminación ($t_{1/2el}$) de 37 – 73 horas (Ravis y col., 1984). La mayor parte se metaboliza en el hígado, y aproximadamente 25 % se excreta sin metabolizar en la orina (Bhatti y col., 2015). Este fármaco produce autoinducción de las enzimas microsomales hepáticas (Hojo y col., 2002), lo que puede reducir la $t_{1/2el}$ cuando se administra en forma crónica (Ravis y col., 1989).

La mayoría de los efectos adversos del FB son dosis dependiente, ocurren al inicio del tratamiento o al aumentar la dosis, y generalmente desaparecen o disminuyen en pocas semanas debido al desarrollo de tolerancia (Thurman y col., 1990). Las reacciones idiosincrásicas al fármaco pueden ser comportamentales o bioquímicas. Los cambios de comportamiento que se observan al iniciar el tratamiento, son hiperexcitabilidad, inquietud o sedación, los cuales parecen no estar relacionados con la dosis y típicamente se resuelven en una semana. En cuanto a las alteraciones bioquímicas, pueden desarrollarse cuadros de neutropenia o trombocitopenia inmunomediada (Jacobs y col., 1998), además de anemia; los cuales suelen resolverse durante los primeros 6 meses de iniciado el tratamiento (Podell, 2008). También pueden aparecer reacciones hepáticas agudas que se evidencian por una elevación rápida de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y niveles anormales de ácidos biliares (Podell, 2008). El uso de FB puede además ser un factor de riesgo para el desarrollo de dermatitis superficial necrótica en caninos (March y col., 2004).

Los efectos adversos crónicos incluyen polidipsia psicogénica con poliuria asociada, polifagia, elevación de la fosfatasa alcalina sérica (FAS) (Bunch y col., 1985) y disminución de los niveles de tiroxina (T4) total y libre (Kantrowitz y col., 2001).

Durante el tratamiento a largo plazo con FB pueden aparecer 3 complicaciones serias que suponen un riesgo potencial para la vida:

- Dependencia física al fármaco; si las concentraciones séricas disminuyen de forma abrupta pueden aparecer crisis convulsivas por retirada;
- Tolerancia funcional al FB, es decir, la pérdida de eficacia del fármaco debido a cambios en la interacción fármaco-receptor, cambios en la distribución del fármaco al encéfalo o progresión de una enfermedad subyacente;
- Hepatotoxicidad secundaria inducida por el fármaco (Podell, 2008).

Bromuro

El Bromuro (Br^-) es un haluro inorgánico con propiedades sedantes y anticonvulsivantes, usualmente administrado en forma de Bromuro de Potasio (KBr), aunque también puede utilizarse la sal de sodio (NaBr) (Bhatti y col., 2015). El KBr fue reportado por primera vez en 1857 (Sieveking, 1857) para el tratamiento de la epilepsia en humanos, y fue descrito para el tratamiento en animales antes de 1876 (Law, 1887). Aunque las Sales de Bromuro todavía se utilizan en el tratamiento de algunos tipos de convulsiones refractarias en niños (Korinthenberg y col., 2007; Nabatame y col., 2010) el uso de KBr en humanos ha descendido a lo largo del siglo XX debido a la disponibilidad de otros fármacos anticonvulsivantes con menos efectos adversos (Friedlander, 2000).

No se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las Sales de Bromuro, aunque se cree que ejercen su actividad antiepiléptica al atravesar los canales de cloro presentes en las neuronas. El Bromuro logra acumularse en el espacio intracelular de las neuronas debido a que atraviesa los canales de cloro en forma pasiva y más rápidamente que el cloruro, ya que tiene un tamaño menor (Bormann y col., 1987). El neurotransmisor inhibitorio GABA potencia el pasaje de Bromuro por estos canales, provocando la hiperpolarización de las membranas neuronales, lo cual aumenta el umbral de crisis y estabiliza las neuronas contra el estímulo excitatorio proveniente del foco epiléptico (Woodbury y Pippenger, 1982). El Bromuro se distribuye en el fluido cerebro-espinal y los tejidos intersticiales del cerebro y es activamente transportado hacia afuera del SNC vía plexo coroideo. A dosis farmacológicas, el mecanismo de transporte activo se satura y el Bromuro se acumula en el cerebro y fluido cerebro-espinal (Pollay, 1967).

Bhatti y col. (2015) reportan que la biodisponibilidad del Bromuro tras su administración en forma de solución por vía oral en caninos es de 46 %, aunque este valor puede variar considerablemente entre individuos (Trepanier y Babish, 1995b). La $t_{1/2el}$ en esta especie es prolongada y puede ir desde 25 a 46 días, consecuentemente puede llevar varios meses (aproximadamente 3) alcanzar las concentraciones en estado estacionario (Trepanier y Babish, 1995b; Podell, 1998). El Bromuro no se une a proteínas plasmáticas y puede difundir libremente a través de las membranas celulares. No sufre metabolización en el hígado, por lo cual es una buena alternativa como tratamiento anticonvulsivante para caninos con disfunción hepática. Esta molécula se excreta inalterada en la orina y sufre reabsorción tubular en competencia con el cloruro (Figura 2). Debido a esto, los factores dietéticos que afectan los niveles de cloruro pueden alterar las concentraciones séricas de Bromuro (Trepanier, 1995). Altas concentraciones de cloruro en la dieta aumentan la excreción de Bromuro y acortan su $t_{1/2el}$, lo contrario ocurre a bajas dosis. En consecuencia, caninos que reciben tratamiento con KBr deben mantener una dieta constante para prevenir fluctuaciones en la ingesta diaria de cloruro, y así no alterar las concentraciones séricas en estado estacionario del Bromuro, evitando fallos terapéuticos (Bhatti y col., 2015).

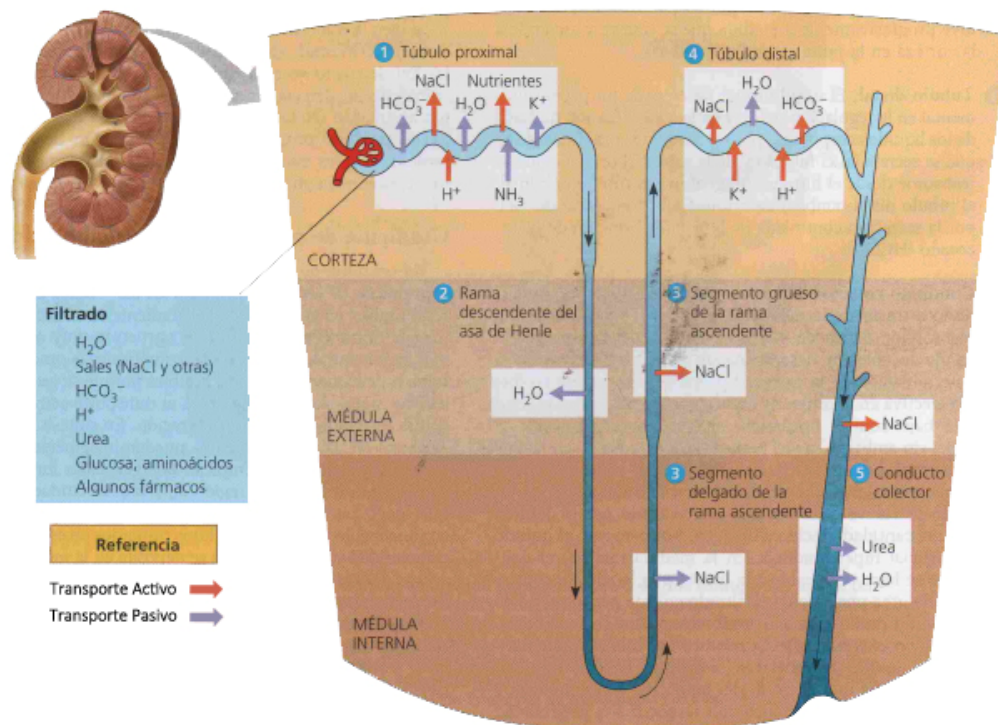


Figura 2. Reabsorción tubular en la nefrona. La reabsorción implica el intercambio de solutos y agua desde la luz tubular hacia el espacio intersticial y capilares sanguíneos. El Bromuro (Br⁻) sufre reabsorción tubular en competencia con el cloruro (Cl⁻), por lo que los sitios indicados para la reabsorción de Cl⁻ coinciden con los de Br⁻ (Campbell y Reece, 2007).

La principal interacción farmacocinética está asociada con alteraciones de la excreción renal de Bromuro. Los diuréticos de asa, como la Furosemida, pueden potenciar la eliminación de Bromuro al bloquear la reabsorción del mismo (Nichols y col., 1996). El uso de fluidoterapia intravenosa que contenga cloruro también aumenta la eliminación de Bromuro, y reduce así su concentración sérica (Taylor, 2009). El tratamiento con KBr debe ser evitado en caninos con falla renal para prevenir toxicidad secundaria a la eliminación urinaria reducida (Nichols y col., 1996).

La dosis recomendada para iniciar el tratamiento con KBr como monodroga es de 20 mg/kg cada 12 horas vía oral. Debido a su prolongada vida media también admite la administración una sola vez al día. Cuando es utilizado en combinación con FB la dosis indicada es de 15 mg/kg cada 12 horas. Los rangos terapéuticos reportados son de aproximadamente 2000 – 3000 µg/mL cuando se utiliza en monoterapia, y de 1000 – 2000 µg/mL cuando se administra junto con el FB (Trepanier y col., 1998). Aunque el KBr fue utilizado tradicionalmente en combinación con el FB, en la actualidad se prescribe cada vez más como único agente farmacológico para el control de estas crisis (Trepanier, 1995; Thomas, 2010).

Los efectos adversos provocados tras la administración de KBr en caninos incluyen: sedación, ataxia y debilidad de miembros posteriores, poliuria/polidipsia y polifagia con ganancia de peso, náuseas, vómitos y/o diarrea. (Trepanier y Babish, 1995a; Thomas, 2010; Baird-Heinz y col., 2012). Estos efectos ocurren en las semanas iniciales del tratamiento y pueden remitir (parcial o completamente) una vez que se estabiliza la concentración sérica de Bromuro (Trepanier y Babish, 1995b). La irritación gastrointestinal y los signos clínicos asociados a la misma pueden ser prevenidos o minimizados administrando el KBr con los alimentos y fraccionando la dosis diaria en 2 o más administraciones (Baird-Heinz y col., 2012). Existen reacciones idiosincrásicas al uso de KBr en caninos, que incluyen cambios comportamentales (agresividad, irritabilidad e hiperactividad), tos persistente, aumento en el riesgo de pancreatitis y megaesófago (March y col., 2002; Podell, 2008; Baird-Heinz y col., 2012).

La intoxicación con Bromuro se denomina bromismo, y puede manifestarse por un conjunto de signos clínicos heterogéneos de disfunción tanto del Sistema Nervioso Periférico (SNP) como del SNC (Rossmeisl e Inzana, 2009). Se ha reportado que las concentraciones séricas a las que el KBr presenta efectos terapéuticos o tóxicos pueden diferir entre individuos, existiendo un solapamiento entre las concentraciones tóxicas y no tóxicas (Baird-Heinz y col., 2012). La intoxicación con Bromuro en caninos se presenta frecuentemente asociada a altas concentraciones séricas del fármaco, sin embargo, se han registrado manifestaciones clínicas de intoxicación a bajas concentraciones en caninos inusualmente sensibles (March y col., 2002). Es así que pueden presentarse tanto casos de intoxicación en pacientes con niveles séricos dentro del rango terapéutico, como pacientes con niveles séricos por encima del rango terapéutico que no manifiestan signos clínicos de intoxicación. En vista de esta

situación, el monitoreo de las concentraciones séricas de Bromuro siempre debe ir acompañado de una evaluación clínica del paciente (March y col., 2002; Baird-Heinz y col., 2012).

Monitoreo terapéutico

El monitoreo terapéutico es la cuantificación de la concentración de una droga en sangre, para evaluar si un paciente en particular presenta concentraciones subterapéuticas, terapéuticas o tóxicas de esa droga. Cuando existe una buena correlación entre la concentración sanguínea de una droga y su eficacia clínica, los ajustes de dosis basados en los niveles observados de la droga resultan en una mejora en la terapéutica de los pacientes (Neff-Davis, 1988).

Los objetivos de monitorear las concentraciones séricas de los FAE son:

- Determinar si al momento de la mínima concentración sérica, los niveles del FAE se encuentran dentro del rango terapéutico, ya que los pacientes tienen más posibilidades de sufrir ataques en esa circunstancia;
- Registrar que las concentraciones séricas fluctúan dentro del rango terapéutico establecido para el FAE cuando se administra de forma crónica (concentración en estado estacionario);
- Prevenir la aparición de efectos tóxicos;
- Prescripción individual del tratamiento (Podell, 2008).

El inicio del tratamiento es el único momento en el cual la administración del FAE se realiza en base al peso del paciente. Todos los ajustes de dosis posteriores deberían realizarse en función de la concentración sérica del fármaco y de los signos clínicos que se presenten (Podell, 2008).

La clave del éxito para el monitoreo terapéutico es saber en qué momento utilizarlo, lo cual dependerá del fármaco empleado. En el caso del KBr, debido al tiempo que tarda en alcanzarse el estado estacionario, se recomienda determinar la concentración sérica a los 3 meses de iniciado el tratamiento o de realizar cambios en la dosis administrada. Si las concentraciones obtenidas se encuentran dentro del rango terapéutico y el paciente se encuentra en buen estado, el monitoreo sanguíneo puede entonces realizarse cada 6 a 12 meses a menos que reaparezcan las convulsiones o se sospeche de signos de intoxicación (Trepanier, 1995; Bhatti y col., 2015; Podell y col., 2016). Debido a la prolongada $t_{1/2el}$ del KBr, el momento de recolección de la muestra de sangre con respecto al momento de la administración oral del fármaco no es crítico (Bhatti y col., 2015).

Validación de un procedimiento analítico

Para el estudio de las concentraciones de Bromuro en suero canino, se utiliza un método de laboratorio basado en espectrofotometría que debe ser validado previo a su empleo rutinario. La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, fundamentándose en la determinación de diversos parámetros (Díaz de Armas y col., 1998). El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado, buscando obtener un método confiable y reproducible (ICH, 2005). Los parámetros a determinar incluyen Linealidad, Exactitud, Precisión, Repetibilidad, Reproducibilidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Estabilidad en la Matriz, Estabilidad en la Muestra Procesada y Recuperación Absoluta (Fundación PROSAIA, 2011).

La Linealidad de un procedimiento es su habilidad, dentro de un rango determinado, para obtener resultados analíticos (señal) que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (ICH, 2005). La Linealidad del método debe describirse mediante un gráfico que valide estadísticamente la regresión lineal de diferentes concentraciones conocidas frente a la señal obtenida (Fundación PROSAIA, 2011).

La Exactitud hace referencia al grado de coincidencia entre el valor real de la concentración del analito y el valor del resultado analítico que se obtiene aplicando el procedimiento experimental (Figura 3), la que generalmente se expresa como porcentaje de recuperación o porcentaje de error. La Exactitud está estrechamente relacionada con el error sistémico (sesgo del método analítico) y la recuperación del analito desde la matriz estudiada (medida como el porcentaje de recuperación) (Fundación PROSAIA, 2011).

La Precisión es el grado de coincidencia entre los resultados de pruebas independientes (Figura 3), obtenidos de material de prueba homogéneo, bajo condiciones estipuladas de uso (Fundación PROSAIA, 2011); se expresa como la varianza (S^2), la desviación o desvío estándar (DS) o el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas. La Precisión debe ser considerada a 3 niveles: Repetibilidad (Intra-día), Precisión Intermedia (Inter-día) y Reproducibilidad. La Repetibilidad es la coincidencia dentro de un período corto para el mismo analista con la misma instrumentación. Precisión Intermedia refiere a la coincidencia en los resultados del mismo laboratorio pero en días distintos con analistas y equipos diferentes (según corresponda). Por último, la Reproducibilidad es la coincidencia en los resultados entre laboratorios diferentes (ICH, 2005). La Repetibilidad y la Precisión Intermedia deben determinarse mediante la evaluación de un mínimo de 3 reproducciones en 3 concentraciones diferentes que representen el rango de validación objetivo (que debe incluir el Límite de Cuantificación) en 3 días de análisis (Fundación PROSAIA, 2011).

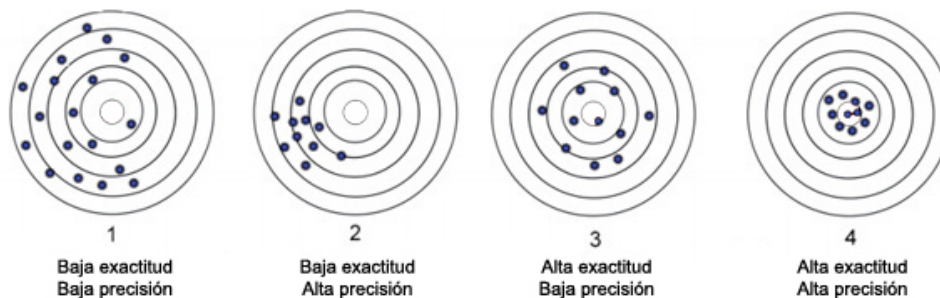


Figura 3. Representación gráfica de los parámetros Precisión y Exactitud. La Precisión hace referencia al grado de coincidencia entre resultados de pruebas independientes, y la Exactitud al grado de coincidencia entre el valor real y el obtenido mediante el procedimiento experimental.

El Límite de Detección (LOD) es la menor medición de concentración de un analito a partir de la cual es posible demostrar la presencia del mismo en la muestra experimental con un grado aceptable de certeza preestablecido. El Límite de Cuantificación (LOQ) es la menor concentración cuantificable de un analito, por encima de la cual la determinación puede realizarse con Exactitud y Precisión, de acuerdo a criterios preestablecidos (Fundación PROSAIA, 2011).

Las muestras recopiladas para ser analizadas generalmente se almacenan hasta realizar el ensayo. Como parte del procedimiento de validación o como un estudio distinto se debe evaluar la Estabilidad para establecer las condiciones de almacenamiento apropiadas y el periodo de tiempo durante el cual se pueden almacenar las muestras antes del análisis (Fundación PROSAIA, 2011).

La Recuperación Absoluta (RA%) del analito es la respuesta obtenida a partir de una cantidad añadida a una matriz biológica, comparada con la respuesta obtenida para la concentración real del estándar puro. La RA% refiere a la eficiencia de extracción de un método analítico dentro de los límites de variabilidad; no es necesario que su valor sea 100 %, pero sí debe ser consistente, preciso y reproducible (FDA, 2001).

La presente tesis pretende validar una técnica espectrofotométrica para la determinación de las concentraciones de Bromuro en suero canino. En segunda instancia, la técnica validada será empleada para el monitoreo de caninos que se encuentren recibiendo tratamiento anticonvulsivo en base a Bromuro de Potasio.

OBJETIVO GENERAL

- Validar la metodología analítica para cuantificar la concentración de Bromuro en suero de caninos medicados con Bromuro de Potasio mediante una técnica espectrofotométrica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Puesta a punto de la metodología analítica de una técnica espectrofotométrica que permita determinar las concentraciones de Bromuro en suero canino.
- Determinar los parámetros de validación: Linealidad, Precisión, Exactitud, Límite de detección, Límite de cuantificación y Recuperación Absoluta, para la técnica espectrofotométrica de cuantificación de Bromuro en suero canino.
- Cuantificar la concentración sérica de Bromuro en caninos medicados con Bromuro de Potasio por vía oral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Lugar de trabajo. El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Farmacología, perteneciente al Área Farmacología (Departamento de Fisiología, Instituto de Biociencias) y en el Laboratorio de Bioquímica (Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Biociencias) de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Fvet – UdelaR).

Sustancias y reactivos. Se comenzó con la preparación de una solución madre (SM) de KBr (KBr extra puro 99,9 % pureza, Laboratorio LUSA, lote: K 44231400) a una concentración de 40 mg/mL de Br⁻. A partir de esta SM se prepararon 8 diluciones seriadas de 40; 30; 20; 10; 5; 2,5; 1,5 y 0 mg/mL de Br⁻.

La precipitación de macromoléculas del suero se realizó utilizando ácido tricloroacético al 10 % (Droguería Industrial Uruguay, lote L130821-03) y la reacción colorimétrica utilizando cloruro de oro (AuCl₃ + H₂O, pureza >49 %, Sigma-Aldrich, lote: BCBH9937V) preparado a una concentración de 0,5 %.

Equipamiento. Se utilizó un espectrofotómetro doble cámara, modelo Shimadzu UV-1800, perteneciente al Laboratorio de Bioquímica, Fvet – UdelaR.

Selección de individuos. Para el protocolo de validación, se utilizó la sangre de 6 caninos de compañía (denominados A, B, C, D, E y F), clínicamente sanos, que no hayan sido medicados con KBr u otra droga en los últimos 6 meses.

En el estudio de casos clínicos se utilizaron 4 pacientes que al momento del ensayo se encontraban en tratamiento en la Unidad de Neurología del Hospital de Facultad de Veterinaria (UdelaR), y 1 proveniente de una clínica veterinaria particular. De estos 5 animales, 2 recibían tratamiento con KBr como monodroga y los 3 restantes lo hacían en combinación con FB. La dosis de KBr utilizada se encontraba en el rango de 10 a 20 mg/Kg cada 12 horas y el FB en el rango de 3,5 a 5 mg/Kg cada 12 horas.

Obtención de matriz. Las muestras se tomaron en diferentes momentos del día sin exigencia de ayuno previo a la extracción. En el caso de los animales utilizados en el protocolo de validación se extrajo sangre en cantidad suficiente en una única vez; para el análisis de casos clínicos se tomaron muestras de sangre al inicio del ensayo (Día 0) con repetición a los 60 días.

La sangre se obtuvo empleando la técnica de extracción sobre la vena cefálica antebraquial, utilizando mariposa calibre 21G y jeringa estéril, almacenando las muestras en tubo seco para posterior centrifugado y

extracción del suero. Desde la obtención de la muestra hasta el centrifugado no transcurrieron en ningún caso más de 2 horas.

Protocolo de trabajo. Se adaptó la técnica espectrofotométrica planteada por Trepanier y Babish (1995b) siguiendo el protocolo obtenido por comunicación personal con los autores. La técnica consiste en la fortificación de 200 μ L de suero con 20 μ L de una solución de concentración conocida de Bromuro (soluciones de trabajo, ST); se precipitan las macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) del suero mediante el agregado de 800 μ L de ácido tricloroacético al 10 %; centrifugación de las muestras a 3000 rpm durante 15 minutos y extracción de 400 μ L del sobrenadante a los cuales se le agregan 80 μ L de cloruro de oro al 0,5 %. Luego de 30 minutos se realiza la lectura espectrofotométrica de la reacción colorimétrica con una longitud de onda de 440 nm.

Para las muestras de sangre de los casos clínicos, el protocolo sólo varía en que no se realiza la etapa de fortificación, ya que se pretende cuantificar la concentración de Bromuro presente en suero debido al tratamiento con KBr que reciben los pacientes.

Estructura de trabajo. Para la validación de la técnica, la metodología de trabajo se repitió durante 3 días consecutivos. Para cada día se prepararon y procesaron 39 muestras, siguiendo el diseño que se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Estructura de trabajo diaria empleada en la validación de la técnica espectrofotométrica para la determinación de Bromuro en suero canino.

[Br] ^a	Animales					
μ g/mL	A	B	C	D	E	F
0	X ^b	X	X	X	X	X
150	X	X	X	X	X	X
250	X	X	X	X	X	X
500	X	X	X			
1000	X	X	X	X	X	X
2000	X	X	X			
3000	X	X	X	X	X	X
4000	X	X	X			

^a [Br]: Concentración de Bromuro

^b Las "X" indican cuales muestras fueron analizadas

Validación del método

El método fue evaluado en función de los siguientes parámetros: Linealidad, Exactitud, Precisión, LOD, LOQ y RA%, de acuerdo a lo indicado por la Fundación PROSAIA en su Guía N° 2 (2011).

Linealidad. Este parámetro se demostró cuantificando por triplicado (animales A, B y C) las siguientes concentraciones de Bromuro ($[Br^-]$): 0, 150, 250, 500, 1000, 2000 y 3000 $\mu\text{g/mL}$. Se construyó un gráfico de absorbancia (ABS) en función de la concentración de Bromuro para cada día de trabajo. La ecuación de regresión lineal, $y = ax + b$, fue calculada a partir de las curvas de calibración mediante el ajuste por mínimos cuadrados, donde a y b representan la pendiente y el intercepto en el eje y, respectivamente; x es la concentración de Bromuro e y representa la señal de absorbancia obtenida. Los valores para el Coeficiente de Determinación (R^2) fueron determinados para cada curva de calibración, con un valor de aceptación $R^2 > 0,99$.

Exactitud. Se expresa como el porcentaje de la recuperación. La Exactitud recomendada varía según la concentración del analito. Para concentraciones mayores a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ los valores recomendados de Exactitud se encuentran en el rango de 80 % a 110 % (Fundación PROSAIA, 2011). El cálculo de la Exactitud se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Concentración de Bromuro recuperada (\mu\text{g/mL})}}{\text{Concentración de Bromuro añadida (\mu\text{g/mL})}} \times 100$$

La Exactitud fue calculada a partir de los niveles de fortificación 150, 250, 1000 y 3000 $\mu\text{g/mL}$ de Br^- , con un $n = 6$ (animales A, B, C, D, E y F).

Precisión. Se expresa como porcentaje del coeficiente de variación (CV %) y su valor recomendado depende de la concentración del analito. La Precisión aceptable para este trabajo, donde la concentración se encuentra por encima de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, es de hasta 15 % (Fundación PROSAIA, 2011). La ecuación para el cálculo de la Precisión es la siguiente:

$$\text{Precisión (CV \%)} = \left(\frac{\text{Desvío estandar}}{\text{Media de datos}} \right) \times 100$$

El cálculo de la Precisión se realizó a partir de los niveles de fortificación 150, 250, 1000 y 3000 $\mu\text{g/mL}$ de Br^- , con un $n = 6$ (animales A, B, C, D, E y F). Se determinó la Repetibilidad (Precisión Intra-día) y la Precisión Intermedia (Precisión Inter-día).

Límite de Detección y Límite de Cuantificación. Existen varias maneras científicamente válidas para determinar estos parámetros. En el presente trabajo se adaptó el procedimiento propuesto por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), descrito en la Guía N°2 de la Fundación PROSAIA (2011). El LOD se calculó para cada día como la media de los resultados de 4 muestras control (animales C, D, E y F) más 3 veces el DS; y el LOQ de cada día de trabajo como la media de estos mismos resultados más 6

veces el DS. Si la Exactitud y la Precisión en el LOQ cumplen los criterios de validación, entonces el LOQ calculado es aceptado.

Recuperación Absoluta. La RA % se calcula acorde a la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación Absoluta (RA \%)} = \frac{\text{Concentración de Bromuro en matriz biológica (mg/mL)}}{\text{Concentración de Bromuro en agua (mg/mL)}} \times 100$$

Se estudió este parámetro utilizando concentraciones de 500 y 1500 µg/mL de Br⁻ por sextuplicado, tanto para la matriz biológica como para el agua. No existe ninguna guía donde se determine un porcentaje mínimo de Recuperación Absoluta, el mismo puede asumir cualquier valor menor al 100 % mientras que la Precisión se encuentre dentro del rango de aceptación en todas las concentraciones analizadas (Fundación PROSAIA, 2011).

Monitoreo de casos clínicos

Con el fin de poner en práctica la técnica espectrofotométrica evaluada en el presente trabajo, se determinó la concentración de Bromuro en el suero de 5 pacientes caninos que estaban recibiendo tratamiento anticonvulsivo con KBr. El monitoreo sérico fue realizado en 2 oportunidades para cada paciente, con un intervalo de 60 días entre ambas muestras.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante test estadísticos descriptivos, con la aplicación del método de ajuste por mínimos cuadrados en el modelo de regresión lineal, visualización de residuales y diagrama de dispersión. Para determinar la variación en el intervalo de monitoreo de los casos clínicos se aplicó la prueba *t* de Student para muestras pareadas. El nivel de significación para las pruebas estadísticas fue del 5 %. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism (Versión 6.01, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del método

Linealidad. Los gráficos de la ABS en función de la concentración de Bromuro en suero canino contruidos para cada día de trabajo se presentan en la Figura 4.

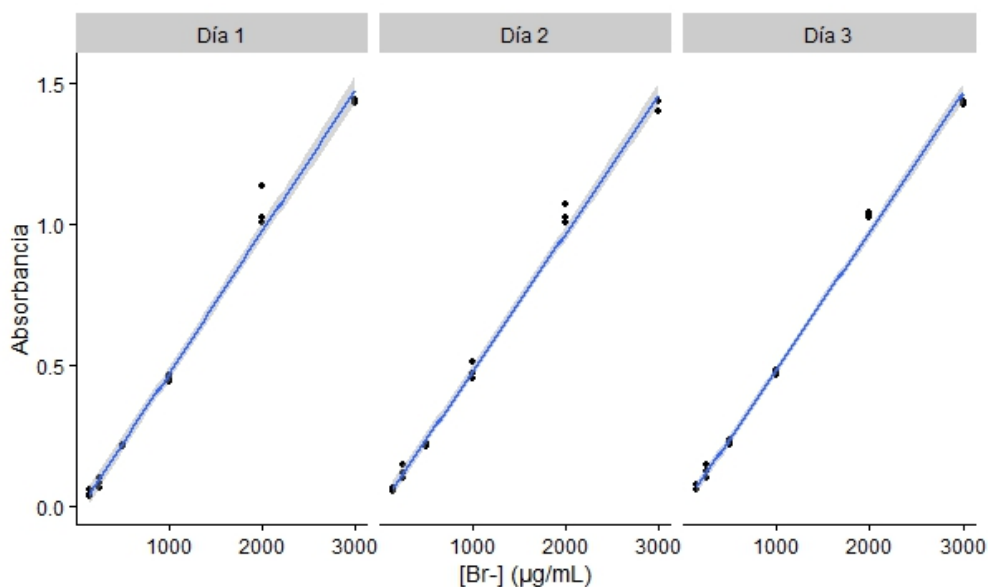


Figura 4. Gráficos de Absorbancia en función de la Concentración de Bromuro ([Br⁻]) cuantificada en suero canino en 3 días de trabajo. Se muestran los datos predichos por el modelo de regresión lineal, con su correspondiente intervalo de confianza.

De acuerdo a los valores reportados (Tabla 2) el modelo explica en un 99% la variación de los datos de ABS en función de la concentración de Bromuro ($p < 0,01$). A su vez, los valores de R^2 se encuentran por encima de 0,99 para los 3 días de trabajo, por lo que queda demostrada la Linealidad para el rango de concentraciones de 150 a 3000 µg/mL de Br⁻.

Tabla 2. Análisis de regresión lineal para la cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino para 3 días de trabajo. La ecuación de regresión lineal es: $y = ax + b$.

	Día 1	Día 2	Día 3
Rango de concentración (µg/mL)	150-3000	150-3000	150-3000
Pendiente (a)	0.001*	0.0005*	0.0005*
	(0.0005, 0.001)	(0.0005, 0.001)	(0.0005, 0.0005)
Intercepto (b)	-0.029	-0.005	-0.002
	(-0.057, -0.002)	(-0.027, 0.017)	(-0.020, 0.016)
n ^c	18	18	18
R ² ^a	0,993	0,995	0,997
Error Std. Residual (gl ^b : 16)	0,048	0,038	0,032
Estadístico F (gl: 1 - 16)	2.145.144*	3.131.579*	4.599.015*

^a R²: Coeficiente de Determinación

^b gl: grados de libertad

^c n: número de muestras

* p<0.01

Los resultados de ABS obtenidos para la concentración de 4000 µg/mL fueron descartados en la construcción de los gráficos ya que la inclusión de ese punto disminuía el R², alejando el método de la Linealidad, con tendencia a la saturación (meseta del gráfico). Dado que los rangos terapéuticos reportados en la bibliografía para el Bromuro son de 1000 – 2000 µg/mL en combinación con Fenobarbital y de 2000 – 3000 µg/mL en monoterapia (Trepanier y col., 1998), la Linealidad del método queda demostrada para los rangos de mayor interés clínico.

Mediante el uso de técnicas espectrofotométricas similares, empleadas para la determinación de la concentración de Bromuro en suero de diferentes especies, se han obtenido rangos de Linealidad mayores al observado en el presente estudio. Quast y col. (2015) reportaron rangos de Linealidad entre 25 y 5000 µg/mL de Br⁻ para ovinos, mientras que Raidal y Edwards (2005) señalaron un rango de 5 a 5000 µg/mL de Br⁻ en equinos. Consideramos que la mayor amplitud en los rangos de Linealidad reportados por los autores citados anteriormente puede explicarse por 2 factores: sensibilidad del equipo y concentración del cloruro de oro. Si bien los artículos citados no especifican marca y modelo del espectrofotómetro utilizado podemos pensar en una mayor sensibilidad, que explicaría la diferencia encontrada en los puntos más bajos de la curva. En cuanto al cloruro de oro, el reactivo utilizado en la presente tesis indicaba un nivel de pureza mayor a 49 %, lo que genera una incertidumbre en relación al número de moléculas de oro presentes para que ocurra la reacción colorimétrica. Un déficit en el número de moléculas de oro podría explicar la meseta en el gráfico al llegar a altos niveles de Bromuro (4000 µg/mL).

Exactitud y Precisión. La Tabla 3 muestra los resultados de Exactitud y Precisión por nivel e Intra-día; en la Tabla 4 se presentan los resultados Inter-día para los mismos parámetros.

Tabla 3. Exactitud y Repetibilidad Intra-día por nivel y global obtenidas en los 3 días de trabajo para la validación de una técnica de cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino.

Día	Concentración de Bromuro (µg/mL)	Por nivel (Intra-día)			Global (Intra-día)		
		DS ^a	Exactitud	Precisión (CV %) ^b	DS ^a	Exactitud (%)	Precisión (CV %) ^b
1	150	13,2	106,9	12,4	10,0	98,4	10,1
	250	9,1	87,8	10,4			
	1000	4,2	97,1	4,3			
	3000	1,6	97,1	1,7			
2	150	9,1	94,1	9,7	8,5	97,2	8,8
	250	15,0	98,0	15,3			
	1000	5,2	96,6	5,3			
	3000	1,1	98,0	1,1			
3	150	12,0	88,6	13,6	9,1	96,2	9,5
	250	13,6	98,8	13,8			
	1000	3,1	95,9	3,2			
	3000	1,2	97,9	1,2			

^a DS: Desvío Estándar

^b CV %: porcentaje del Coeficiente de Variación

Tabla 4. Exactitud y Precisión Intermedia (Inter-día) por nivel y global obtenidas para la validación de una técnica de cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino.

Concentración de Bromuro (µg/L)	Por nivel (inter-día)			Global (inter-día)		
	DS ^a	Exactitud	CV % ^b	DS ^a	Exactitud (%)	CV % ^b
150	13,4	96,5	13,9	9,2	97,3	9,4
250	13,1	94,9	13,8			
1000	4,0	96,5	4,1			
3000	1,3	97,7	1,3			

^a DS: Desvío Estándar

^b CV %: porcentaje del Coeficiente de Variación

Los ensayos por nivel en los 3 días de trabajo presentaron valores de Exactitud entre 87,8 y 106,9 %, y de Precisión entre 1,1 y 15,3 %. En el análisis Intra-día, la Exactitud varió entre 96,2 y 98,4 %, mientras que la Precisión se encontró en el rango de 8,8 y 10,1 %. Para la totalidad del ensayo (resultados globales Inter-día) los valores fueron de 97,3 % y 9,4 % para Exactitud y Precisión, respectivamente. En resumen, todos los valores obtenidos estuvieron dentro de los rangos de aceptación planteados para estos parámetros, con excepción de la Precisión en la concentración 250 µg/mL del día 2. A este nivel la Precisión fue de 0,3 % por encima del límite de aceptación, dato que no influyó en la Precisión global del día 2 que fue de 8,8 %.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación. Los valores de LOD y LOQ calculados para cada día se presentan en la Tabla 5. Los valores calculados de LOD se encuentran en el rango de 43 a 96 µg/mL de Br⁻ y los de LOQ entre 87 y 138 µg/mL. Dada la amplitud de estos rangos para ambos parámetros, en lugar de utilizar un valor global de los 3 días, se decidió definir el LOD y el LOQ en base al peor escenario posible, es decir, aquellos valores más elevados. A su vez, el LOQ calculado se encuentra por debajo de la menor concentración contemplada en el rango de Linealidad (150 µg/mL), por lo que el LOQ se define a este nivel. Dado que a esta concentración se cumplen los criterios de validación para Exactitud y Precisión, el LOQ es aceptado. En resumen, el ensayo presenta un LOD de 96 µg/mL y un LOQ de 150 µg/mL de Br⁻.

Tabla 5. Límite de Detección y Límite de Cuantificación obtenidos en los 3 días de trabajo para la validación de una técnica de cuantificación de la Concentración de Bromuro en suero canino.

	Concentración de Bromuro (µg/mL)		
	Día 1	Día 2	Día 3
LOD ^a	96,0	49,0	43,0
LOQ ^b	138,0	92,0	87,0

^a LOD: Límite de Detección

^b LOQ: Límite de Cuantificación

En la bibliografía consultada se encontraron artículos sobre cuantificación de la concentración de Bromuro en suero de diferentes especies. Raidal y Edwards (2005), en un ensayo sobre farmacocinética de KBr en equinos, definen un LOQ de 5 µg/mL, mientras que Quest y col. (2015), en un trabajo similar realizado en ovinos, reportan un LOQ de 25 µg/mL. Trepanier y Babish (1995b), en un estudio farmacocinético de Bromuro en caninos, definen el LOD en 20 µg/mL, sin mención al LOQ. En todos los casos, los valores reportados fueron menores a los calculados en el presente trabajo. Sin embargo, ninguno de estos artículos especifica el método utilizado para el cálculo de LOD y LOQ, lo cual genera varios puntos de discusión. En primera instancia, existen diversas maneras científicamente válidas para determinar estos parámetros (Fundación PROSAIA, 2011), por lo que esto podría explicar en parte la

diferencia encontrada entre los distintos ensayos. Otro factor a tener en cuenta es el n utilizado para los cálculos de ambos parámetros. En el presente ensayo se encontró una alta variación entre los 3 días de trabajo para los valores de LOD y LOQ que podría explicarse por el empleo de un n bajo ($n = 4$). El aumento del n para el cálculo de estos parámetros podría mejorar los resultados obtenidos y conferirles mayor valor estadístico. Por último, los artículos mencionados no hacen referencia a marca y modelo de los equipos utilizados, por lo que podrían existir diferencias en la sensibilidad de los mismos que explicarían parte de las diferencias encontradas en los valores de LOD y LOQ.

Durante el transcurso de este ensayo, se cuantificaron las muestras experimentales en 3 equipos diferentes: MetroLab 1600DR, Spectronic 21 y Shimadzu UV1800. El MetroLab 1600DR fue descartado debido a que sólo lograba detectar concentración de Bromuro por encima de 500 $\mu\text{g/mL}$ (datos no presentados). Con el segundo equipo, Spectronic 21, si bien se lograron determinar todas las concentraciones planteadas, al momento de analizar los datos los valores de Precisión y Exactitud no cumplían los criterios de validación (datos no presentados). En conclusión, el único equipo utilizado que permitió la validación de la técnica fue el Shimadzu 1800UV.

Recuperación Absoluta. Los resultados obtenidos para los ensayos de RA % en los niveles de fortificación de 500 y 1500 $\mu\text{g/mL}$ fueron de 100,3 % y 96,6 % respectivamente, y la RA % global del ensayo es de 98,4 %. Con el valor de RA % global obtenido, y debido a que la Precisión del método es de 9,4 %, se demuestra que la extracción de Bromuro de suero canino es casi total y el RA % es aceptado. Estos valores obtenidos permiten el intercambio de matriz entre suero canino y agua destilada para el uso rutinario en el laboratorio, por ejemplo, al momento de realizar curvas de calibración.

Monitoreo de Casos Clínicos.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos del monitoreo de las concentraciones séricas de Bromuro de los 5 casos clínicos incluidos en el ensayo. En todas las muestras analizadas se detectó Bromuro, lo que brinda valor práctico a la técnica.

Tabla 6. Monitoreo al Día 0 y Día 60 de las concentraciones séricas de Bromuro en 5 pacientes caninos medicados con Bromuro de Potasio.

Paciente	Concentración de Bromuro ($\mu\text{g/mL}$)	
	Día 0	Día 60
1	1849	2314
2	2227	1996
3	1180	1582
4	2938	3082
5	1376	1805

Para analizar los resultados obtenidos del monitoreo clínico de los pacientes que estaban recibiendo KBr, se decidió comparar los datos del Día 0 con los del Día 60 agrupando los datos de los 5 pacientes para cada momento. En la Figura 5 se muestran los datos obtenidos para cada paciente en forma individual, y agrupados por día de muestreo. El análisis estadístico mediante el Test *t* de Student para muestras pareadas arroja un $p=0,1388$, lo cual demuestra que no hay diferencias significativas entre los datos del Día 0 con los del Día 60. Al momento del muestreo, todos los pacientes habían estado recibiendo KBr por un período mayor a 6 meses, por lo cual es esperable que la concentración de Bromuro sérico ya se encontrara en estado estacionario y por ende no haya variación significativa entre los valores de ambos grupos muestrales.

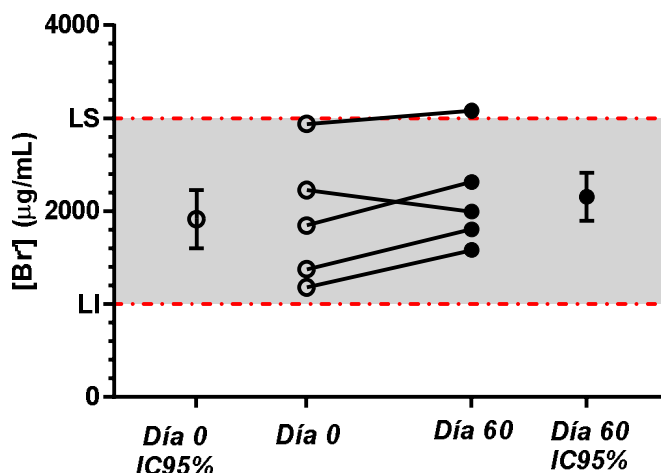


Figura 5. Concentraciones de Bromuro sérico cuantificadas en 5 pacientes caninos en tratamiento antiépiléptico con Bromuro de Potasio (KBr). LI y LS representan, respectivamente, el límite inferior y superior del rango terapéutico total (KBr como monodroga o en combinación con Fenobarbital). [Br⁻]: concentración de Bromuro.

Todos los pacientes estaban recibiendo KBr respetando las dosis recomendadas en la bibliografía y presentaron concentraciones séricas de Bromuro dentro del rango terapéutico, sin embargo, el grado de control de las convulsiones no fue el esperado en todos los casos (comunicación personal de los propietarios). Esto deja en evidencia que para poder realizar un correcto seguimiento del paciente, el monitoreo sérico de una droga deberá ir siempre acompañado de una adecuada evaluación clínica.

CONCLUSIONES

Los valores obtenidos para los distintos parámetros analizados documentan que la técnica espectrofotométrica para la cuantificación de Bromuro en suero canino queda validada para el rango de concentraciones de 150 µg/mL a 3000 µg/mL, en las condiciones de trabajo del Laboratorio del Área Farmacología (LaFaVet – FVet – UdelaR) empleando el espectrofotómetro Shimadzu 1800UV (Área Bioquímica – FVet – UdelaR).

Los resultados obtenidos mediante el uso de la técnica en pacientes medicados con Bromuro de Potasio coinciden con la literatura consultada en cuanto a rango terapéutico y estabilidad de los niveles de la droga en sangre con tratamientos de largo plazo. Esto avala y da respaldo a la validación realizada.

La validación de esta técnica permite poner a disposición del Hospital de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), de Clínicas Privadas y de Médicos Veterinarios de libre ejercicio, una herramienta más para el monitoreo de los pacientes en tratamiento anticonvulsivo con Bromuro de Potasio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Tahan F., Frey H.H. (1985). Absorption kinetics and bioavailability of phenobarbital after oral administration to dogs. *J Vet Pharmacol Ther*; 8: 205-207.
2. Baird-Heinz H.E., Van Schoick A.L., Pelsor F.R., Ranivand L., Hungerford L.L. (2012). A systematic review of the safety of potassium bromide in dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 240: 705-715.
3. Berendt M., Farquhar R.G., Mandigers P.J., Pakozdy A., Bhatti S., De Risio L., Fischer., Long S., Matiassek K., Muñana K., Patterson E.E., Penderis J., Platt S., Podell M., Potschka H., Batlle Pumarola M., Rusbridge C., Stein V.M., Tipold A., Volk H.A. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Vet Res*; 11: 182.
4. Bhatti S., De Risio L., Muñana K., Penderis J., Stein V.M., Tipold A., Berendt M., Farquhar R.G., Fischer A., Long S., Löscher W., Mandigers P.J., Matiassek K., Pakozdy A., Patterson E.E., Platt S., Podell M., Potschka H., Rusbridge C., Volk H.A. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus proposal: medical treatment of canine epilepsy in Europe. *BMC Vet Res*; 11: 176.
5. Boothe D.M., Dewey C., Carpenter D.M. (2012). Comparison of phenobarbital with bromide as a first-choice antiepileptic drug for treatment of epilepsy in dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 240: 1073-1083.
6. Bormann J., Hamill O.P., Sakmann B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol*; 385: 243-286.
7. Bunch S.E., Castleman W.L., Baldwin B.H., Hornbuckle W.E., Tennat B.C. (1985). Effects of long-term primidone and phenytoin administration on canine hepatic function and morphology. *Am J Vet Res*; 46: 105-115.
8. Cabo-de la Vega C., Villanueva-Hernandez P., Prieto-Martín A. (2006). Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol*; 42: 159-168.
9. Chang B.S., Lowenstein D.H. (2003). Mechanisms of disease. *Epilepsy. N Engl J Med*; 349: 1257-1266.
10. De Risio L., Bhatti S., Muñana K., Penderis J., Stein V., Tipold A., Berendt M., Farquhar R., Fischer A., Long S., Mandigers P.J., Matiassek K., Packer R., Pakozdy A., Patterson N., Platt S., Podell M., Potschka H., Pumarola Batlle M., Rusbridge C., Volk H.A. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs. *BMC Vet Res*; 11: 148.
11. Díaz de Armas M., Hernández I., Martínez de Santelices M., Licea Tornés M., Gómez L., Louro G., Morera Y., González E. (1998). Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Rev Cubana Farm*; 32(2): 106-112.
12. Engel J. (1989). *Seizures and epilepsy*. Philadelphia, FA Davis, 536 p.
13. Engel J. (2001). A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42: 796–803.

14. Farnbach G.C. (1984). Serum concentrations and efficacy of phenytoin, phenobarbital, and primidone in canine epilepsy. *J Am Vet Med Assoc*; 184: 1117-1120.
15. FDA (2001). Guidance for industry, bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>. Fecha de Consulta: 13 de Julio 2015.
16. Feijóo G., Rodríguez-Serpa C., Fumagalli F., Cardoso R., Delucchi L. (2011). Convulsiones: Estudio retrospectivo de casos clínicos atendidos en Facultad de Veterinaria en pacientes caninos y felinos (2005 – 2010). 7° Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay, p. 125-126.
17. Friedlander W.J. (2000). The rise and fall of bromide therapy in epilepsy. *Arch Neurol*; 57: 1782-1785.
18. Fundación PROSAIA (2011). Guía Para la Validación de los Métodos Analíticos para la Determinación de Residuos en Matrices Biológicas de Origen Animal. Disponible en: <http://www.prosaia.org/wp-content/uploads/2015/01/Prosaia-2-GF-Gu%C3%ADa-para-la-validaci%C3%B3n-de-m%C3%A9todos-anal%C3%ADticos-2013-05-17-.pdf>. Fecha de consulta: Junio 2013.
19. Hojo, T., Ohno, R., Shimoda, M., Kokue, E. (2002). Enzyme and plasma protein induction by multiple oral administrations of phenobarbital at a therapeutic dosage regimen in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*; 25(2): 121-127.
20. ICH Expert Working Group. (2005). Validation of Analytical Procedures Text and Methodology Q2 (R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Fecha de consulta: Julio 2015.
21. Jacobs G., Calbert C., Kaufman A. (1998). Neutropenia and thrombocytopenia in three dogs treated with anticonvulsivants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212:681-4.
22. Kantrowitz, L.B., Peterson, M.E., Melián, C., Nichols R. (2001). Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with non thyroidal disease. *J Am Vet Med Assoc*; 219(6): 765-769.
23. Knowles K. (1998). Idiopathic epilepsy. *Clinical Tech Small Anim Pract*; 13: 144-151.
24. Korinthenberg R., Burkart P., Woelfle C., Moetinger J.S., Ernst J.P. (2007). Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol*; 22: 414-418.
25. Law J. (1887). A guide to the prevention and treatment of disease in domestic animals. 2a ed., New York, Trow's, 656 p.
26. Lorenzo V., Bernardini M. (2007). Neurología del Perro y el Gato. Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, 420 p.
27. March P.A., Podell M., Sams R.A. (2002). Pharmacokinetics and toxicity of bromide following high-dose oral potassium bromide administration in healthy Beagles. *J Vet Pharmacol Ther*; 25: 425-432.
28. March, P.A., Hillier, A., Weisbrode, S.E., Mattoon, J.S., Johnson, S.E., DiBartola, S.P., Brofman, P.J. (2004). Superficial necrolytic dermatitis in 11 dogs with a history of phenobarbital administration (1995-2002). *J Vet Intern Med*; 18: 65-74.

29. Morales C., Montoliu P. (2012). *Neurología Canina y Felina*. Barcelona, Multimédica, 560 p.
30. Nabatame S., Saito Y., Sakuma H., Komaki H., Nakagawa E., Sugai K., Sasaki M., Uchiyama K., Kosaka M. (2010). Bromoderma in a patient with migrating partial seizures in infancy. *Epilepsy Res*; 91: 283-288.
31. Neff-Davis C.A. (1988). Therapeutic drug monitoring in veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 18(6): 1287-1307.
32. Nichols E.S., Trepanier L.A., Linn K. (1996). Bromide toxicosis secondary to renal insufficiency in an epileptic dog. *J Am Vet Med Assoc*; 208: 231-233.
33. Noebels J.L. (2003). Exploring New Gene Discoveries in Idiopathic Generalized Epilepsy. *Epilepsia*, 44(2): 16-21.
34. Podell M. (1996). Seizures in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 26(4): 779-809.
35. Podell M. (1998). Antiepileptic drug therapy. *Clin Tech Small Anim Pract*; 13: 185-92.
36. Podell M. (2008). Crisis Convulsivas. En: Platt S.R., Olby N.J. *Manual de Neurología en Pequeños Animales*. Barcelona, Ediciones S, 624 p.
37. Podell M., Volk H.A., Berendt M., Löscher W., Muñana K., Patterson E.E., Platt S.R. (2016). 2015 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Seizure Management in Dogs. *J Vet Intern Med*; 30: 477-490.
38. Pollay, M. (1967). The processes affecting the distribution of bromide in blood, brain, and cerebrospinal fluid. *Exp Neurol*; 17(1): 74-85.
39. Quast, T.A., Combs, M.D., Edwards, S.H. (2015). Pharmacokinetics of bromide in adult sheep following oral and intravenous administration. *Aust Vet J*; 93(1-2): 20-25.
40. Raidal, S.L., Edwards, S. (2005). Pharmacokinetics of potassium bromide in adult horses. *Aust Vet J*; 83(7): 425-430.
41. Ravis, W.R., Nachreiner, R.F., Pedersoli, W.M., Houghton N.S. (1984). Pharmacokinetics of phenobarbital in dogs after multiple oral administration. *Am J Vet Res*; 45(7): 1283-1286.
42. Ravis W.R., Pedersoli W.M., Wike J.S. (1989). Pharmacokinetics of phenobarbital in dogs given multiple doses. *Am J Vet Res*; 50: 1343-1347.
43. Rossmeisl Jr J.H., Inzana K.D. (2009). Clinical signs, risk factors, and outcomes associated with bromide toxicosis (bromism) in dogs with idiopathic epilepsy. *J Am Vet Med Assoc*; 234(11): 1425-1431.
44. Schwartz-Porsche D., Löscher W., Frey H.H. (1985). Therapeutic efficacy of phenobarbital and primidone in canine epilepsy: a comparison. *J Vet Pharmacol Ther*; 8: 113-119.
45. Sieveking E.H. (1857). Analysis of 52 cases of epilepsy as observed by the author. *Med Chir Trans*; 40: 157-166.
46. Taylor S. M. (2009). Seizures. En: Nelson R.W., Couto C.G. *Small Animal Internal Medicine*. Saint Louis, 4a ed., Mosby, p. 1036-1053.
47. Thomas W.B. (2010). Idiopathic epilepsy in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 40: 161-179.
48. Thurman, G.D., McFadyen, M.L., Miller, R. (1990). The pharmacokinetics of phenobarbitone in fasting and non-fasting dogs. *J S Afr Vet Assoc*; 61: 86-9.
49. Trepanier L.A. (1995). Use of bromide as an anticonvulsant for dogs with epilepsy. *J Am Vet Med Assoc*; 207(2): 163-166.

50. Trepanier L.A., Babish J.G. (1995a). Effects of dietary chloride content on the elimination of bromide by dogs. *Res Vet Sci*; 58: 252-255.
51. Trepanier L.A., Babish J.G. (1995b). Pharmacokinetic properties of bromide in dogs after the intravenous and oral administration of single doses. *Res Vet Sci*; 58: 248-251.
52. Trepanier L.A., Van Schoick A., Schwark W.S., Carrillo J. (1998). Therapeutic serum drug concentrations in epileptic dogs treated with potassium bromide alone or in combination with other anticonvulsants: 122 cases (1992-1996). *J Am Vet Med Assoc*; 213:1449-53.
53. Woodbury D.M., Pippenger C.E. (1982). Other antiepileptic drugs: bromides. En: Woodbury D.M, Penry J.K., Pippenger C.E. *Antiepileptic drugs*. New York, Raven Press, p. 791-801.
54. Wyler A.R., Burchiel K.J., Ward A.A. (1978). Chronic epileptic foci in monkeys: correlation between seizure frequency and proportion of pace maker cells. *Epilepsia*; 19: 475-483.