

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

MONITORIZACIÓN DEL FENOBARBITAL EN SALIVA DE CANINOS EPILÉPTICOS

por

**ESPINOSA PRETTE, Catherine Yamil
STURCHIO PIÑEYRO, Micaela**

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY**

2022

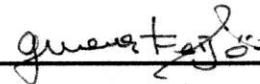
PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:



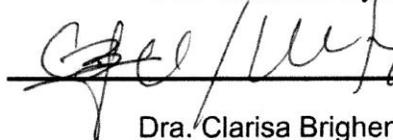
Q.F. Natalia Guevara

Segundo miembro (Tutor):



Dra. Gimena Feijóo

Tercer miembro:



Dra. Clarisa Brighenti

Cuarto miembro (Co-tutor):

5 de julio 2022.

Dra. Silvana Alvariza

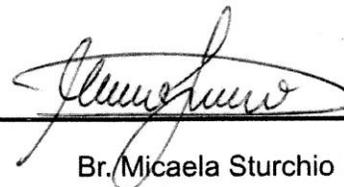
Fecha:



Autores:



Br. Catherine Yamil Espinosa Prette



Br. Micaela Sturchio Piñeyro

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Dra. Gimena Feijoó por siempre estar disponible para ayudarnos y guiarnos en este proceso, por enseñarnos tanto y a su vez querer aprender de nosotras. Por su trato amable y cálido que nos mantuvo entusiasmadas en tiempos difíciles.

A nuestra co-tutora Dra. Silvana Alvariza por acompañarnos y tenernos la paciencia necesaria para compartir su conocimiento en la materia de manera que nosotras le podamos enseñar a otros, y por iniciarnos en el hermoso mundo de la investigación.

Al Dr. Juan Pablo Damián por recibirnos cuando iniciamos el proyecto y por interesarse en el mismo. Por explicarnos todo sobre su trabajo, que tanto nos ayudó en la realización de esta tesis.

A las personas integrantes de la Unidad de Monitoreo de Medicamentos del Hospital de Clínicas Doctor Manuel Quintela, que nos recibieron tantas veces sin conocernos y nos auxiliaron en el uso adecuado de las muestras y los equipos.

Al área de Farmacología de Facultad de Veterinaria, por poner su laboratorio y docentes a disposición, por el buen trato de todo el equipo.

A todos los docentes que nos formaron a lo largo de nuestra carrera en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, por compartir nuestra pasión por lo que hacemos y nuestra vocación, por ayudarnos a llegar a cerrar este ciclo y poder comenzar el siguiente.

Al hospital de Facultad de Veterinaria y a los tutores de las mascotas que participaron de este ensayo.

A nuestros compañeros de trabajo, por asistirnos en la búsqueda de caninos que cumplan con los requerimientos necesarios para formar parte del proyecto.

A nuestras familias, amigos y compañeros de facultad, por ser siempre un pilar emocional fundamental.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. Epilepsia	8
2.2. Fisiopatología	9
2.3. Clasificación	9
2.4. Status epiléptico y Clúster.....	11
2.5. Diagnóstico	12
2.6. Tratamiento:	13
2.7. Fenobarbital	14
2.8. Monitoreo terapéutico	15
2.9. Saliva como muestra biológica para el TDM	15
2.10. Validación de una técnica analítica	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo General	19
3.2. Objetivo Específico.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Animales	19
4.2. Extracción de muestras	19
4.3. Análisis de Laboratorio.....	20
4.4. Análisis estadístico	20
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIONES.....	23
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
9. ANEXOS.....	28
9.1. Anexo 1	28
9.2. Anexo 2	32

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Origen anormal de descargas convulsivas generalizadas (a), focales (b) y focal progresando a generalizada (c). Extraído de Platt, S. y Olby, N., 2014. 11

Figura 2. Relación entre las concentraciones en saliva y suero de Fenobarbital extraídos de 14 caninos epilépticos medicados con la droga y analizados por HPLC.. 21

Tabla 1. Promedio de las dosis diarias administradas de Fenobarbital en pacientes caninos epilépticos, concentraciones en saliva y suero, agrupadas según si controlan o no, con su correspondiente coeficiente de variación. 21

RESUMEN

En medicina veterinaria el monitoreo de la concentración de fenobarbital (FB) en pacientes que reciben esta droga como tratamiento para la epilepsia se realiza en forma rutinaria en muestras de suero sanguíneo. Este método es invasivo y en algunos pacientes es poco práctico debido a las dificultades que puede presentar su manejo. En la presente tesis se evaluó la utilidad de la saliva como matriz biológica para la monitorización del FB en pacientes epilépticos. Con este objetivo se extrajeron muestras de saliva y suero en forma simultánea a 14 perros epilépticos (siete machos y siete hembras) tratados con FB en monoterapia por al menos dos semanas al momento de la toma de su toma. Ambas muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta performance para la determinación de las concentraciones del anticonvulsivante. La correlación entre las concentraciones séricas y salivales de FB resultó altamente significativa, con un coeficiente de correlación de Pearson (r) = 0.90, lo que lleva a postular a la saliva como fluido biológico alternativo útil para el monitoreo de la droga. El rango terapéutico propuesto para la saliva fue estimado entre 4 y 12 $\mu\text{g/mL}$.

SUMMARY

In veterinary medicine, monitoring of phenobarbital (PB) concentration in patients receiving this drug as a treatment for epilepsy is routinely performed on blood serum samples. This method is invasive and in some patients, it is impractical due to the difficulties that handling them may represent. In this thesis, the usefulness of saliva as a biological matrix for monitoring PB in epileptic patients was evaluated. To accomplish this, saliva and serum samples were simultaneously extracted from 14 epileptic dogs (seven males and seven females) treated with PB in monotherapy for at least two weeks at the time of sampling. Both samples were analyzed by high performance liquid chromatography to determine anticonvulsant concentrations. The correlation between serum and salivary concentrations of PB was highly significant, with a Pearson correlation coefficient (r) = 0.90, which leads to the postulation of saliva as a useful alternative biological fluid for monitoring the drug. The proposed therapeutic range for saliva was estimated to be between 4 and 12 $\mu\text{g/mL}$

1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas crónicas de mayor prevalencia en animales de compañía. Se trata de una enfermedad cerebral compleja, en la cual un grupo de neuronas tienen una actividad repentina que da como resultado el signo clínico de convulsión (Berendt et al., 2015). Es una condición heterogénea, ya que tiene diferentes etiologías, patrones comportamentales y electrofisiológicos diversos, así como también, distintas respuestas al tratamiento entre los individuos (Platt y Olby, 2012).

El FB es desde hace varios años el fármaco de primera elección para el tratamiento de la epilepsia en medicina veterinaria, debido a sus propiedades farmacocinéticas y la relativa seguridad para su administración en caninos. Se ha determinado su eficacia para el control de las convulsiones en un 60-93% de los caninos tratados con esta droga, siempre y cuando sus concentraciones se ubiquen en niveles eficaces y seguros. Se ha propuesto como rango terapéutico poblacional de referencia el intervalo 15-45 µg/mL para sus concentraciones plasmáticas (Fernández y Bernardi, 2007).

Por esta razón es importante realizar el monitoreo terapéutico (TDM) de la droga, el cual nos permite realizar ajustes en la dosis de los pacientes en busca de una mejoría clínica, siendo considerado rutinario en el tratamiento de pacientes epilépticos. Se trata de medir las concentraciones del fármaco en una matriz biológica, siendo el plasma y el suero los más utilizados, aunque en medicina humana, el uso de saliva para el TDM está en aumento (Patsalos., Spencer y Berry, 2018). Esta se considera una técnica no invasiva para la obtención de muestras que tiene además la ventaja de reflejar para algunas drogas la concentración libre del fármaco, verdadera responsable de sus efectos.

Sin embargo, para establecer la utilidad este fluido para el TDM en caninos es necesario primero determinar una correlación entre las concentraciones en suero y en saliva del fármaco a evaluar, en este caso, el FB (Horning et al., 1977).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epilepsia

La epilepsia es una condición neurológica crónica y compleja, que se caracteriza por presentar crisis convulsivas recurrentes (Chrisman, Mariani, Platt y Clemmons, 2003). Es uno de los desórdenes neurológicos más frecuentes que se presentan en caninos, con una prevalencia estimada de 0.6-0.75% en la población canina general (Volk, 2015). Si nos referimos más específicamente a la prevalencia en nuestro país, en la Unidad de Neurología del Hospital de Facultad de Veterinaria (UDELAR), la frecuencia de convulsiones entre los años 2005 y 2010 osciló entre un 7% a un 23% de la consulta neurológica y de 0.4 a 2% de la consulta general del Hospital (Feijóo, Rodríguez-Serpa, Fumagalli, Cardoso y Delucchi, 2011).

Las convulsiones son producto de la actividad anormal de un grupo de neuronas, sujetas a descargas eléctricas paroxísticas, excesivas, incontroladas y transitorias (Chrisman, 1986), que, al propagarse, conducen a una gran variedad de manifestaciones clínicas, dependiente de la localización y extensión del área afectada a nivel de la corteza cerebral (Fernández y Bernandini, 2007).

2.2. Fisiopatología

Los mecanismos básicos de la epileptogénesis se basan en la capacidad de ciertas poblaciones neuronales de generar descargas eléctricas excesivas, sincrónicas y de alta frecuencia que generan una señal electroencefalografía correspondiente con un campo eléctrico prominente y de gran amplitud asociados a despolarizaciones prolongadas en el potencial de membrana celular y paroxismos de potenciales de acción en grandes grupos neuronales (Pellegrino, 2003). Los influjos que recibe una neurona provocan la despolarización de la membrana, lo que produce un cambio en su permeabilidad con apertura selectiva de los canales iónicos. La superación del umbral de despolarización genera un potencial de acción normal, que de verse alterado provoca una despolarización paroxística, capaz de superar la influencia inhibitoria de las neuronas circundantes y difundir a otras áreas cerebrales generando las manifestaciones clínicas típicas de una convulsión (Muñana, 2013; Rosas Martínez y Peña Baena, 2016).

Como consecuencia de esta excitación neuronal sin control inhibitorio, se produce la liberación de grandes cantidades de calcio y potasio, éstos activan enzimas intracelulares que provocan muerte neuronal. A largo plazo, pueden formarse conexiones aberrantes en las neuronas supervivientes que perpetúan la aparición de las crisis convulsivas (Feliu-Pascual y Vicens, 2016).

2.3. Clasificación

La epilepsia es una enfermedad compleja, al igual que su clasificación. Hay una falta de consenso y confusión en medicina veterinaria acerca de la clasificación de los tipos de epilepsia y las convulsiones. Durante los últimos años se han publicado diferentes propuestas que responden a las clasificaciones seguidas por la *International League Against Epilepsy* (ILAE). Es necesario tener presente al momento de adoptar términos provenientes de la neurología humana, algunas de las diferencias significativas en su aplicación a pequeños animales, en los que la interpretación de los signos que manifiestan los pacientes, se encuentra restringida a la descripción verbal y eventuales registros de imagen que pueda aportar el tutor del animal. Otro pilar importante en la clasificación de epilepsia en seres humanos es el estado de conciencia, que en medicina veterinaria siempre será una apreciación subjetiva. Este aspecto se alinea mejor con los desafíos que sufre la pediatría, por lo que el *International Veterinary Epilepsy Task Force* (IVETF) plantea un sistema de clasificación sencillo y que facilita el diagnóstico por parte del clínico, beneficiando a los pacientes (Berendt et al., 2015).

Tipos de epilepsia según la etiología:

- i. Idiopática: la causa subyacente de las crisis convulsivas se desconoce, no hay evidencias de daño estructural y se sospecha de causas genéticas, principalmente en algunas razas como Pastor australiano, Border collie, Collie, Golden retriever, Labrador retriever, entre otras, donde se ha encontrado una mayor prevalencia en estudios epidemiológicos y clínicos, pero no se ha determinado una mutación genética causante (Hülsmeier et al., 2015). La edad de comienzo de las convulsiones se ubica entre los 6 meses y los 6 años (Montoliu, Morales y Fernández, 2018).
- ii. Estructural: las convulsiones son provocadas por una patología intracraneal, pudiendo ser de origen vascular, inflamatorio/infeccioso, traumático, del desarrollo, neoplásico o degenerativo (Berendt et al., 2015).

Tipos de convulsiones según la sintomatología clínica y el área afectada a nivel de la corteza cerebral:

- i. Focales: las descargas eléctricas se originan en un grupo circunscrito de neuronas en un único hemisferio cerebral, presentando una sintomatología clínica relacionada al área involucrada a nivel de la corteza cerebral.
Cursan con una sintomatología regional o lateralizada, pudiendo presentar signos motores (parpadeo rítmico, movimientos faciales, contracciones de un miembro), autonómicos (salivación, vómitos) y/o comportamentales (hiperactividad, temor, agresividad).
- ii. Generalizadas: las descargas eléctricas involucran a ambos hemisferios cerebrales y presenta una sintomatología bilateral.
Se caracterizan por presentar pérdida de conciencia, actividad motora involuntaria, pudiendo ser tónicas, clónicas o tónico-clónicas, y pueden presentar salivación, defecación y micción (Berendt et al., 2015).

Las crisis focales pueden generalizarse de forma secundaria y afectar bilateralmente a la corteza cerebral. Esto puede ocurrir tan rápido, que puede no notarse el comienzo focal del episodio (Figura 1) (Thomas, 2010). Aunque anteriormente se creía que los episodios generalizados tónico-clónicos eran los más frecuentes, se determinó que los episodios focales que se generalizan secundariamente son los que afectan más frecuentemente a los caninos (al igual que en humanos) (Berendt et al., 1999; Thomas, 2010).

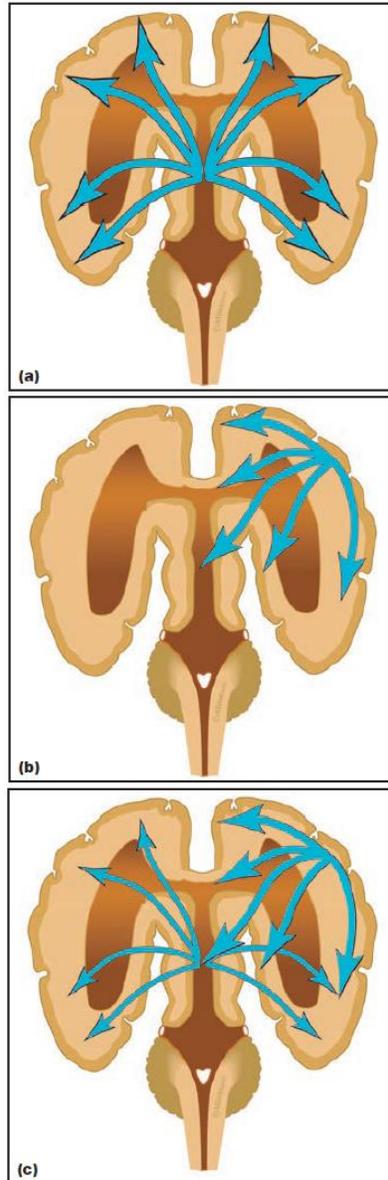


Figura 1. Origen anormal de descargas convulsivas generalizadas (a), focales (b) y focal progresando a generalizada (c). Extraído de Platt, S. y Olby, N., 2014.

2.4. Status epiléptico y Clúster

Las convulsiones pueden llegar a presentarse en forma de status epiléptico o en clúster. El status epiléptico se define como una crisis epiléptica que se prolonga en el tiempo por más de 5 minutos, o como 2 o más crisis epilépticas que se producen sin recuperación total de la conciencia entre éstas (Zimmermann, Hülsmeier, Sauter-Louis y Fischer 2009). Asimismo, los episodios en clúster se definen como 2 o más crisis epilépticas que

ocurren en un período de 24 horas con recuperación total de la conciencia entre éstas, o como múltiples crisis que ocurren en un corto período de tiempo (Patterson, 2014). La actividad epiléptica prolongada, por más de 30 minutos lleva a un daño neuronal irreversible, relacionado a la liberación excesiva de glutamato, por el aumento de la actividad neuronal. La sobreestimulación de los receptores de glutamato permite el ingreso de calcio a las neuronas, lo que lleva a lesiones celulares excitotóxicas, necrosis y muerte celular (Huff y Fountain, 2011). Otras consecuencias a nivel sistémico son el desarrollo de hipertermia, hiperglicemia, arritmias cardíacas, daño renal, alteraciones cardiorrespiratorias, entre otras (Patterson, 2014). Por todo esto es que tanto el status epiléptico como los episodios en clúster son potencialmente mortales, considerándose emergencias neurológicas, necesitando de un rápido diagnóstico y tratamiento, para disminuir el riesgo de muerte súbita o de eutanasia en caninos que presentan epilepsia; este desenlace desafortunado está relacionado con la edad de aparición del primer episodio, el tratamiento antiepiléptico (animales que no lo recibieron) y la hipertermia a consecuencia de la propia convulsión (Cagnotti et al., 2020).

2.5. Diagnóstico

Debido a que en perros las crisis epilépticas pueden confundirse con trastornos paroxísticos no epilépticos (arritmias, hipoglucemia, hipocortisolemia, alteraciones electrolíticas, narcolepsia, miastenia gravis, entre otros) es importante distinguir estos trastornos de las crisis convulsivas propiamente dichas (Nelson y Couto, 2010).

La anamnesis detallada es sustancial, ésta nos permitirá (además de diferenciar entre convulsiones y otros episodios paroxísticos) caracterizar el ataque (Montoliu, 2012). El cuestionario sobre los ataques o episodios debe incluir: eventos ocurridos antes de la aparición (posible desencadenante), cambios de comportamiento observados previos al episodio (ansiedad, falta de descanso, búsqueda de afecto o escondite, agresividad, vocalizaciones), duración y características del episodio, nivel de conciencia durante el mismo, signos autónomos que pudieran apreciarse (defecación, orina, salivación excesiva), tono muscular (aumentado, normal, disminuido) y cambios en el comportamiento posteriores al episodio (desorientación, agresividad, andar sin rumbo, letargia, sueño profundo, ataxia, sed, ceguera) (De Risio et al., 2015).

Un examen objetivo general completo nos ayudará a identificar cualquier anomalía sugestiva de un proceso subyacente que esté causando los episodios, ya sean crisis epilépticas o no (por ejemplo: disfunciones del sistema cardiovascular) (De Risio et al., 2015). Luego del examen objetivo general se realiza un examen neurológico, éste nos permitirá detectar déficits de origen intracraneal (indicativo de epilepsia estructural). El mismo debe realizarse en el período interictal ya que en el período postictal pueden presentarse déficits transitorios (desorientación, tetraparesia, pérdida de visión) que no implican una lesión focal del sistema nervioso central. También debe tenerse en cuenta la administración de drogas como diazepam y FB, luego de las cuales hay que aguardar

al menos varias horas y 15 días, respectivamente, para realizar el examen neurológico (Montoliu, 2012).

Es relativamente complicado llegar a un diagnóstico confirmatorio de epilepsia idiopática, por este motivo primero se trata de llegar al diagnóstico de cualquier enfermedad primaria. Ante un examen físico normal, es necesaria la toma de muestras de sangre y orina para la realización de exámenes paraclínicos (hemograma completo, bioquímica sanguínea, análisis de orina completo) y un estudio de electroencefalograma (EEG). Si no se encuentran anomalías, se puede diagnosticar casi con certeza una epilepsia de origen idiopático (Pellegrino, 2003).

2.6. Tratamiento:

El tratamiento en pacientes epilépticos se basa en la administración de fármacos antiepilépticos que tienen como objetivo restaurar el equilibrio entre los mecanismos inhibitorios y excitatorios neuronales, con desaparición o reducción clínicamente significativa de las crisis epilépticas. Aunque existen muchos fármacos antiepilépticos, pocos pueden ser usados en caninos debido a la corta semivida de eliminación que presentan en estos pacientes, que las hacen impracticables (Chandler, 2006). Si bien las opciones de tratamiento anticonvulsivante en perros se ha centrado en el uso de FB y bromuro de potasio (KBr); existen actualmente varios fármacos anticonvulsivantes disponibles aprobados para su uso en medicina humana que están siendo utilizados en medicina veterinaria, como el levetiracetam, zonisamida, felbamato, topiramato, gabapentina y pregabalina, en general en terapia combinada con FB y/o KBr (Pellegrino, 2020).

El momento de inicio del tratamiento farmacológico, se basa en su frecuencia y severidad (Lane y Bunch, 1990). Aunque lo ideal en una terapia anticonvulsivante es lograr el control completo de las crisis, esto no siempre se puede lograr, siendo el principal objetivo terapéutico disminuir su frecuencia, severidad, prevenir los episodios en clúster y el status epiléptico, mejorando la calidad de vida del paciente (Potschka et al., 2015). Entre los pacientes hospitalizados por status epiléptico o clúster, existe mayor riesgo de un mal pronóstico en aquellos que no han recibido tratamiento previo para controlar las convulsiones (Cagnotti, 2020).

Se estima que un 30 % de los perros epilépticos son refractarios al tratamiento farmacológico (Muñana, 2013). La sobreexpresión de los transportadores de eflujo a nivel del foco epiléptico ha sido propuesta como una de las principales causas del fracaso farmacoterapéutico (Tishler et al., 1995).

Muchas de las drogas anticonvulsivantes comúnmente utilizadas son sustratos de estas bombas, por lo que su entrada a ciertas zonas del cerebro se ve disminuida en casos de sobreexpresión, llevando a bajas concentraciones del fármaco a nivel sus sitios de acción (Potschka, 2002). Los transportadores de eflujo constituyen una familia de proteínas de membrana que se expresan en diferentes tejidos, limitando la entrada de sus moléculas

sustrato a diferentes territorios del organismo y facilitando su salida del mismo. La glucoproteína-P (Pgp) fue el primer transportador descubierto y de los mejores estudiados hasta el momento. Se lo identificó en un principio como un mecanismo de resistencia de las células tumorales a la terapia antineoplásica, para ser luego descripta como constitutiva de una variedad de tejidos como hígado, intestino, riñón, páncreas, barrera hematoencefálica (BHE), plexos coroideos, placenta, testículos, glándula salival, etc. (Alvariza, Fagiolino, Vázquez, Fera-Romero y Orozco-Suárez, 2014; Staud, Ceckova, Micuda y Pavek, 2010). Lazarowski et al. en 2006 postularon que en la epilepsia farmacorresistente, la sobreexpresión de estos transportadores no se limitaba al foco epiléptico, si no que se extendía a todos los órganos que los expresan.

2.7. Fenobarbital

El FB, que fuera utilizado como anticonvulsivante por primera vez hace más de 100 años en medicina humana, es considerado hasta hoy el fármaco de elección para el control de convulsiones en pacientes epilépticos en medicina veterinaria (Montoliu, 2012; Yasiry y Shorvon, 2012).

Pertenece a la familia de los barbitúricos y ejerce su acción anticonvulsivante al ser agonista de los receptores GABA, prolongando la apertura de los canales de cloruro (Rodríguez, Guevara y Lobo, 2010). Además, presenta un efecto antiepiléptógeno o neuroprotector, aumentando la resistencia a la apoptosis, evitando el daño neuronal progresivo (Pellegrino, 2003).

Es un medicamento relativamente seguro, eficaz y accesible. Cuenta con una alta biodisponibilidad y cuando se administra por vía oral es absorbido rápidamente alcanzando su concentración máxima en sangre entre las 4 y las 8 horas posteriores a su administración (Nelson y Couto, 2010). Es metabolizado principalmente en el hígado por las enzimas CYP2C9 y CYP2C19. Es un potente inductor enzimático, lo que lleva a la reducción de su semivida de eliminación y aumento de su aclaramiento plasmático de manera concentración dependiente en tratamientos crónicos. Se eliminan por excreción renal metabolitos inactivos y alrededor de un tercio del fármaco de forma inalterada (Podell, 2013).

La dosis recomendada para el tratamiento anticonvulsivante en perros es de 2.5-5 mg/kg/12 horas, y el rango terapéutico poblacional en plasma de este fármaco está comprendido entre 15 – 45 µg/mL (Fernández y Bernardi, 2007).

Los efectos adversos asociados al uso del FB incluyen: sedación, ataxia, poliuria, polidipsia y polifagia. Éstos suelen ser concentración dependiente, y generalmente aparecen en las primeras semanas de tratamiento o al aumentar la dosis, y suelen disminuir o desaparecer luego de unas semanas. Reacciones idiosincrásicas al fármaco pueden ocurrir, pero no son habituales, e incluyen: hepatotoxicidad, alteraciones hematológicas (anemia, trombocitopenia, neutropenia), dermatitis superficial necrótica, entre otros (De Risio y Platt, 2014).

2.8. Monitoreo terapéutico

El TDM implica la medición de las concentraciones de un fármaco en un fluido biológico, generalmente plasma, suero o sangre, con el objetivo de determinar el rango de concentraciones efectivas de la droga luego de instaurado el tratamiento, con el fin de individualizar el tratamiento y establecer si una falla terapéutica se debe a factores farmacocinéticos, farmacodinámicos o a una falta de adherencia al tratamiento (Podell et al., 2016).

Esta herramienta se reserva en general para aquellos fármacos de estrecha ventana terapéutica, fármacos con alta variabilidad farmacocinética y fármacos en los que es posible establecer claramente la relación entre concentración y efectos (Spector, Park, Johnson y Vessel, 1988).

Las pautas de extracción de muestras para llevar a cabo el TDM varían según el fármaco a monitorear, dependiendo de sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas y del momento en el que exista una mejor correlación farmacocinética-farmacodinámica, pudiendo recurrirse a concentraciones de pico, valle, concentración a una hora post-dosis, dos horas post-dosis, o área bajo la curva a intervalos variables; en el caso del FB se sugiere tomar la muestra a pre-dosis (dentro de la hora previa a la administración de la siguiente dosis). Este punto tiene la ventaja de ser el más reproducible de un muestreo a otro, permitiendo un mejor ajuste posológico (Winter, 2010).

El TDM implica no solamente la obtención de un valor de concentración, sino que requiere conocimientos sobre farmacocinética, el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de la droga en cuestión y la historia y estado clínico del paciente (Ghiclescu, 2008)

En medicina veterinaria no hay reportes sobre la eficacia del uso del TDM de drogas, pero en medicina humana un análisis estadístico indica un importante aumento de la eficacia clínica y una disminución de la toxicidad con su implementación (Visser, 2018). Estos avances obtenidos a partir del TDM de fármacos en medicina humana se deben a la dificultad que representa identificar la dosis óptima para cada paciente basándose únicamente en criterios clínicos, ya que el tratamiento antiepiléptico es profiláctico (busca prevenir la aparición de nuevas convulsiones), además, la correlación entre la concentración sérica de fármacos anticonvulsivantes y los efectos clínicos es mayor que la existente entre la dosis del fármaco con su efecto y no hay marcadores de laboratorio que indiquen toxicidad de fármacos antiepilépticos ni eficacia clínica (Patsalos y Berry, 2013).

2.9. Saliva como muestra biológica para el TDM

La saliva es un fluido complejo que baña la cavidad oral. Es utilizada cada vez con más frecuencia en medicina veterinaria como muestra biológica, en alternativa a la sangre, teniendo en cuenta el bienestar animal por ser un método no invasivo (Damián, Bengoa,

Pessina, Martínez y Fumagalli, 2018). En medicina humana el uso de saliva ha sido clínicamente aceptado en un número limitado de fármacos, siendo uno de estos el FB, sobre el cual se ha detectado una alta correlación entre las concentraciones en el fluido oral y la sangre (Gutierrez et al., 1994; Knott y Reynolds, 1984; Mucklow, Bacon, Hierons, Webb y Raelins, 1981), considerándose entonces a la saliva como una buena alternativa al uso de la sangre para el TDM del FB. Sin embargo, en medicina veterinaria no se han hecho tantos estudios al respecto. Los mismos son escasos y su objetivo es establecer una relación entre las concentraciones de FB en sangre y saliva. Uno de ellos es el trabajo de Dunnet, Littleford y Lees (2002), en el que se utilizaron 8 perros de diferentes razas, sexo y edad y en el que se detectó una buena correlación entre la dosis diaria de FB y su concentración en sangre, pero no así con la concentración en saliva; mientras que el otro trabajo, de Watanabe et al., (1981), en el cual se utilizaron 4 perros raza Beagle para la extracción de muestras, señala que las concentraciones de FB en saliva y en sangre presentaron una correlación significativa. A partir de estos trabajos no se puede afirmar que exista una buena correlación ya que los resultados comparados son contradictorios y el número de animales utilizados en las investigaciones no es suficiente para arribar a resultados con significancia estadística.

La saliva es el producto final de las glándulas salivales, las mismas están constituidas por acinos (fondos de saco) que desembocan en un mismo conducto en la cavidad oral a través de una serie de ductos microscópicos. La misma es un filtrado del plasma sanguíneo que, en su estado inicial (dentro del acino), se asemeja mucho a la composición electrolítica del plasma, variando la concentración de moléculas no difusibles (unidas a proteínas) (Fagiolino, 1999).

La secreción de saliva de los animales monogástricos se produce en dos etapas; la primera es isotónica con respecto al plasma y está compuesta principalmente por sodio (Na^+), potasio (K^+), cloro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-). La secreción secundaria se produce cuando la primaria atraviesa los ductos, allí se produce una reabsorción de Na^+ y Cl^- , y una secreción de K^+ y HCO_3^- . El agua no atraviesa los ductos, por lo tanto (dada la reabsorción de Na^+), la saliva a este nivel es hipotónica con respecto al plasma. Estas concentraciones se ven modificadas si aumenta la velocidad de producción (por estímulo parasimpático), en cuyo caso la saliva que llega a la cavidad oral (secundaria) es similar a la producida en los acinos (primaria) ya que no hay tiempo suficiente para que se produzca el intercambio en los ductos (Sernka y Jacobson, 1981).

Las células que recubren los ductos de las glándulas salivales, en respuesta a la hormona secretina (secretada en las células duodenales, por una disminución en el pH de la luz duodenal), son capaces de incrementar la excreción de Na^+ y K^+ hacia la saliva para aumentar la alcalinidad de esta a modo de buffer que neutraliza las sustancias ácidas que puedan ser consumidas (Goff, 2015).

La mayoría de los mamíferos tienen al menos tres pares de glándulas salivales: las parótidas, situadas debajo del oído y detrás de la rama vertical de la mandíbula, las

mandibulares, situadas en el espacio intramandibular y las linguales que se localizan en la base de la lengua; además de estas, existen otras glándulas secundarias en la lengua y en la mucosa de la boca, las cuales presentan numerosos conductos secretores que se abren en el interior de la cavidad oral (Klein, 2013).

El pasaje de drogas proveniente del torrente sanguíneo a la saliva dependerá de propiedades fisicoquímicas de la molécula, tales como el tamaño, la liposolubilidad, la unión a proteínas plasmáticas y el pKa, y propiedades fisiológicas como lo son el pH del medio, el flujo salival y patologías en la cavidad oral. La mayoría de las drogas atraviesan la membrana acinar por difusión pasiva, por lo que las moléculas deben ser liposolubles, no ionizadas y no unidas a proteínas plasmáticas (solo la porción libre de la droga en sangre estará presente en saliva); ésta última porción (libre) es considerada farmacológicamente activa, por lo que es un mejor indicador de la actividad farmacológica de la droga (Elmongy y Abdel-Rehim, 2016). El flujo a través de la membrana es bidireccional y la difusión y el equilibrio de la droga ocurre según un gradiente de concentración (Liu y Delgado, 1999).

El flujo salival es un factor clave en el pasaje de la droga; al estimular la secreción de saliva se acelera el flujo, lo que disminuye las variaciones en las concentraciones del FB en sangre y saliva (además de permitir la obtención de volúmenes mayores), al minimizar los intercambios que se producen en el trayecto de la saliva por los conductos salivales (Fagiolino, 1999) (Liu y Delgado, 1999). La estimulación de saliva también reduce el gradiente de pH entre la sangre y la saliva, favoreciendo la difusión de la droga (Elmongy y Abdel-Rehim, 2016). Además, el volumen de saliva obtenido sin estimulantes puede no ser suficiente para la realización de pruebas en la misma, especialmente si se trata de perros pequeños o en ayunas (Damián et al., 2018).

El pH salival y el pKa de la molécula son las variables más importantes en la difusión de la droga hacia la saliva; el grado de ionización de la droga dependerá del pKa de la droga y el pH del fluido. Para ácidos débiles como el FB, la diferencia de concentración entre la sangre y la saliva disminuye en pH más básicos (Liu y Delgado, 1999). Se podría utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbach para predecir el cociente de concentraciones saliva/suero (S/S), la cual para drogas ácidas se expresa de la siguiente forma:

$$S/S = \frac{1 + 10^{(pH_{saliva} - pKa)}}{1 + 10^{(pH_{suero} - pKa)}} \cdot \frac{f_{suero}}{f_{saliva}}$$

Siendo f_{suero} y f_{saliva} las fracciones de droga libre en el suero y la saliva (Fagiolino, 1999). El valor del pH salival de caninos ha sido determinado, obteniéndose resultados promedio de 8.53, con una desviación estándar de 0.34 (Lavy, Goldberger, Friedman y Steinberg, 2012).

El uso de saliva podría ser una herramienta útil para el TDM, pero dado que la secreción y composición salival es muy variable, es necesario un protocolo estandarizado para la obtención y procesamiento de las muestras para que el fluido oral sea un fiel reflejo de lo que sucede en el organismo (Elmongy y Abdel-Rehim, 2016). Uno de los principales requisitos para considerar a la saliva como fluido para la monitorización será determinar una relación constante entre las concentraciones en sangre y en saliva de la droga (Langman, 2007).

2.10. Validación de una técnica analítica

La validación de una técnica analítica es el proceso mediante el cual se demuestra que un procedimiento analítico es adecuado para el propósito previsto (ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). En el caso de las técnicas bioanalíticas, tienen como finalidad la identificación, caracterización y determinación de fármacos en matrices biológicas. La mayoría de las técnicas involucra el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual tiene como objetivo separar y cuantificar la droga seleccionada como objeto de estudio de sus metabolitos, componentes del plasma y otras drogas que pueda estar recibiendo el paciente. (Patel, Patel, Ahir y Singh, 2019).

Para asegurar que un método analítico reproduzca un resultado válido y coherente, debe ser validado mediante la realización de una serie de pruebas y evaluaciones de las que se obtienen, para técnicas cuantitativas de medición de drogas, datos de exactitud, precisión, especificidad/selectividad, límite de detección, linealidad y rango de trabajo, recuperación, incertidumbre de la medición y estabilidad de la matriz (United Nations Office on Drugs and Crime [UNODC], 2010).

Durante la presente tesis se realizó la validación parcial de una técnica de analítica por HPLC para la determinación de las concentraciones de FB en saliva y suero canino.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar la utilidad de la saliva como alternativa al suero en la monitorización de FB en perros.

3.2. Objetivo Específico

- Determinar la correlación entre la concentración de FB en saliva y en suero, y proponer una ventana terapéutica de referencia para este fluido alternativo

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) – Protocolo número 799

4.1. Animales

Participaron de este estudio 14 perros epilépticos (7 machos y 7 hembras) con edades de entre 4 meses y 15 años, en tratamiento con FB que al momento de la toma de muestra se hallaban en estado estacionario de sus niveles plasmáticos de la droga (tratados por un mínimo de 20 días), que concurrieron a la consulta neurológica a la Policlínica de Neurología del Centro Hospital de la Facultad de Veterinaria (UDELAR) y provenientes de Clínicas Veterinarias privadas. Para su inclusión, cada paciente contó con el consentimiento previo de sus tutores. No se discriminó por sexo, edad ni raza.

4.2. Extracción de muestras

La extracción de saliva se realizó a partir de la técnica descrita por Damián et al., en 2018, que consiste en la utilización de un rollo de algodón dental previamente embebido con 1.5 mL de una solución de ácido cítrico al 5% y secado en estufa a una temperatura de 60°C durante 5 horas. El algodón con el ácido cítrico, sostenido en uno de los extremos por una pinza hemostática, es introducido en la cavidad oral y vestibular del animal durante aproximadamente 1 minuto; se utilizaron dos algodones por animal para asegurar un volumen mínimo de 0.5 mL de saliva. Los algodones embebidos en saliva del animal son luego introducidos en un tubo plástico cónico de 50 mL con tapa de rosca, sostenidos por una malla sintética, con poros de 2 mm y centrifugados a 3000 rpm para la obtención de la saliva. Simultáneamente se realizó la extracción sanguínea a nivel venoso de un volumen mínimo de 2 mL en tubo seco y centrifugadas a 2000 rpm para obtener el suero. Ambas muestras (sangre y saliva) fueron extraídas a pre-dosis y conservadas a -20°C hasta el momento del análisis.

4.3. Análisis de Laboratorio

La fase analítica del estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (LAFAVET), de la Unidad de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria.

Las concentraciones séricas y salivales de FB fueron determinadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante la técnica descrita por Herkes, McKinnon y Eadie (1998) con modificaciones menores. (Anexo I y II)

La técnica analítica resultó lineal entre 1 y 25 µg/mL de FB para saliva y entre 1 y 80 µg/mL de FB para suero. Los coeficientes de variación para la precisión inter e intradía fueron menores al 15% y la exactitud de la técnica estuvo entre 85 y 115% de acuerdo con la Guías de la Food and Drug Administration [FDA] para la validación de métodos analíticos (2018).

4.4. Análisis estadístico

La relación entre la concentración salival (Csal) y la concentración sérica (Csuero) de FB se analizó mediante regresión lineal.

Las Csal y Csuero medias y el cociente saliva/suero (S/S) y sus coeficientes de variación (CV (%)) fueron analizados mediante Test de Student para datos no apareados, previa realización del Test de Fischer para verificación de homocedasticidad de varianzas. las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

Se determinó una correlación entre las concentraciones de FB en saliva y suero, a través del Coeficiente de Pearson de $(r) = 0.90$ (Figura 2) y un S/S de 0.28.

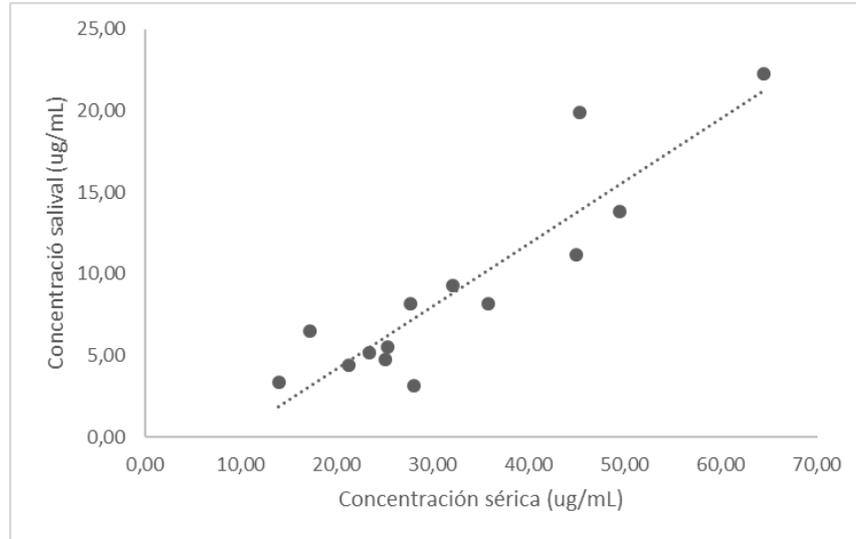


Figura 2. Relación entre las concentraciones en saliva y suero de FB extraídos de 14 caninos epilépticos medicados con la droga y analizados por HPLC.

A modo de hallazgo, se encontraron un mayor Csal y un mayor S/S en aquellos pacientes que presentaban un pobre control de sus crisis convulsivas.

La Tabla 1, muestra las concentraciones salivales y séricas y sus cocientes agrupados según el control de crisis de los pacientes. Se puede observar cómo los pacientes que no controlan sus crisis muestran un cociente S/S significativamente superior, a pesar de que tanto las dosis recibidas como las concentraciones séricas no presentan diferencia estadística entre los grupos.

Tabla 1. Promedio de las dosis diarias administradas de FB en pacientes caninos epilépticos, concentraciones en saliva y suero, agrupadas según si controlan o no, con su correspondiente coeficiente de variación.

	Dosis diaria (mg/kg)		Csal ($\mu\text{g/mL}$)		Csuero ($\mu\text{g/mL}$)		S/S	
	Controla	No controla	Controla	No controla	Controla	No controla	Controla	No controla
Promedio	0.392	0.616	4.83	11.19	23.24	35.92	0.21	0.32
CV (%)	38.347	71.553	37.61	56.98	22.52	48.13	28.8	27.92
Sig	NS		p < 0.05		NS		p < 0.05	

Csal: concentración salival; Csuero: concentración sérica; S/S: cociente de concentraciones saliva/suero; CV: coeficiente de variación; Sig: significancia estadística; NS: no significativo; p: valor p.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una buena correlación (Coeficiente de Pearson (r) = 0.90) entre las concentraciones de FB en saliva y suero (Figura 2) y un S/S de 0.28. Este resultado se asemeja a lo reportado por Gutiérrez et al, 1994 para pacientes neonatos bajo tratamiento con FB, pero difiere de lo predicho por la ecuación de Henderson-Hasselbach según la cual la difusión de FB hacia un fluido a un pH de 8.53 como el informado para perros, debería ser mayor a la obtenida. Esto podría explicarse por el método de extracción, el cual involucra la utilización de ácido cítrico como estimulante, generando un mayor flujo en la secreción salival, disminuyendo su pH y lo uniformiza con el pH sanguíneo. Esto puede confirmarse a través del estudio realizado por Damián et al., 2018, donde se evaluaron diferentes métodos para la extracción de saliva, comprobándose que el uso del ácido cítrico generaba efectivamente pH más bajos. Son necesarios mayores estudios enfocados en la influencia del método de extracción sobre las concentraciones obtenidas de FB para poder confirmar esta teoría. En cuanto a la diferencia entre los cocientes S/S de los pacientes que controlan y los que no, la mayor Csal y el mayor S/S en aquellos pacientes que no controlaban, podría deberse a una mayor expresión de los transportadores de eflujo Pgp en glándula salival y en el sistema nervioso central. Esto también se ve reflejado en el trabajo de Maldonado et al. en 2008 en el cual se reportaron mayores concentraciones salivales de carbamazepina y ácido valproico en pacientes pediátricos con epilepsia refractaria, respecto de los respondedores al tratamiento farmacológico y proponen que esta diferencia podría deberse a una mayor expresión de los transportadores de eflujo Pgp a nivel de la glándula salival en aquellos pacientes con un pobre control de sus crisis, lo que generaría una mayor extrusión de estas moléculas hacia la luz de los acinos y por lo tanto una mayor concentración del fármaco en el fluido salival. En este sentido Lazarowski et al. en 2006 propuso que, en pacientes con epilepsia refractaria debido a la sobreexpresión de transportadores de eflujo en el parénquima cerebral y la barrera hematoencefálica, este aumento en la expresión no se limita al foco epileptógeno sino que se extiende a todos los órganos que constitutivamente los expresan, entre los que se encuentra la glándula salival según lo reportado por Alvariza et al. en 2014.

7. CONCLUSIONES

Debido a la buena correlación existente entre las concentraciones de FB en saliva y suero, podemos concluir que la saliva es una buena alternativa a este último para realizar el monitoreo terapéutico de la droga. Su obtención misma mínimamente invasiva no requiere operador entrenado, por lo que es posible de ser realizada en domicilio por los tutores del paciente. Esto permitiría por ejemplo la extracción de la muestra inmediatamente después de un episodio convulsivo, pudiendo establecer, por ejemplo, si la crisis se debe a una disminución en las concentraciones del anticonvulsivante en el momento de la convulsión a niveles ineficaces.

La ventana terapéutica propuesta para la saliva es de entre 4 y 12 $\mu\text{g/mL}$. Se requieren más estudios que involucren un mayor número de pacientes para verificar este rango.

El mayor valor de cociente S/S para pacientes refractarios al tratamiento farmacológico podría deberse a la sobreexpresión de transportadores de eflujo a nivel de la glándula salival reflejando lo que ocurre a nivel de la barrera hematoencefálica en los focos epilépticos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvariza, S., Fagiolino, P., Vázquez, M., Feria-Romero, I., y Orozco-Suárez, S. (2014). Chronic administration of phenytoin induces efflux transporter overexpression in rats, *Pharmacological Reports*, 66(6), 946-951.
- Berendt, M., Farquhar, R.G., Mandigers, P.J., Pakozdy, A., Bhatti, S., De Risio, L... y Volk, H.A. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification, and terminology in companion animals. *BMC Veterinary Research*, 11(182), 1-11.
- Berendt, M., y Gram, L. (1999). Epilepsy and seizure classification in 63 dogs: a reappraisal of veterinary epilepsy terminology. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(1), 14-20.
- Cagnotti, G., Ferrini, S., Ala, U., Bellino, C., Corona, C., Dappiano, E., y D'Angelo, A. (2020). Analysis of early assessable risk factors for poor outcome in dogs with cluster seizures and status epilepticus. *Frontiers in veterinary science*, 7(575551), 1-8.
- Chandler, K. (2006). Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *The Veterinary Journal*, 172(2), 207-217.
- Chrisman, C.L. (1986). *Problemas Neurológicos en Pequeñas Especies* (2ª ed.). Ciudad de México: Compañía Editorial Continental.
- Chrisman, C.L., Mariani, C., Platt, S., y Clemmons R. (2003). *Neurology for the Small Animal Practitioner*. Jackson: Teton NewMedia.
- Damián, J.P., Bengoa, L., Pessina, P., Martínez, S., y Fumagalli, F. (2018). Serial collection method of dog saliva: Effects of different chemical stimulants on behaviour, volume, and saliva composition. *Open Veterinary Journal*, 8(3), 229-235.
- De Risio, L., Bhatti, S., Muñana, K., Panderis, J., Stein, V., Tipold, A., y Volk, H. (2015). International veterinary task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs. *BMC Veterinary research*, 11(148), 1-11.
- De Risio, L., y Platt, S. (2014). *Canine and Feline Epilepsy: Diagnosis and Management*. Wallingford: CABI Publishing.
- Dunnett M., Littleford A., y Lees P. (2002). Phenobarbitone concentrations in the hair, saliva, and plasma of eight epileptic dogs. *The Veterinary Record*, 150(23), 718-24.
- Elmongy, H., y Abdel-Rehgm, M. (2016). Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: A review. *Trend in Analytical Chemistry*, 83, 70-79.
- Fagiolino, P. (1999). *Monitorización de fármacos en saliva: Aplicaciones biofarmacéuticas, farmacocinéticas y terapéuticas*. Montevideo: UDELAR.
- Food and Drug Administration. (2018). *US FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Recuperado de <https://www.fda.gov/media/70858/download>.
- Feijóo, G., Rodríguez-Serpa C., Fumagalli, F., Cardoso, R., y Delucchi, L. (2011). Convulsiones: Estudio retrospectivo de casos clínicos atendidos en Facultad de Veterinaria en pacientes caninos y felinos (2005 - 2010). En *VII Jornadas Técnicas*

- de la Facultad de Veterinaria (pp. 125-126). Montevideo: Facultad de Veterinaria, UDELAR.
- Feliu-Pascual, A.L., y Vicens, L. (2016). Estado epiléptico y convulsiones en serie: manejo efectivo. *Argos*, 180, 32-38.
- Fernández, V.L., y Bernardini, M. (2007). *Neurología del perro y el gato*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Ghiculescu, R.A. (2008). Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. *Australian Prescriber*, 31(2), 42-44.
- Goff, J (2015). Secretory Activities of the Gastrointestinal Tract. En W. Reece, H. Erickson, J. Goff y E. Uemura (Eds.), *Duke's physiology of domestic animals* (pp 484-501). Iowa: Wiley Blackwell.
- Gutierrez, S., Vázquez, M., Amodio, A., Giachetto, G., Moller, D., Queirolo, M., ... y Fagiolino, P.L. (1994). Phenobarbital Pharmacokinetics in Infants Using Saliva as a Biologic Fluid. *Journal of Pharmacy Technology*, 10(6), 250-254.
- Herkes, G., McKinnon, E., y Eadie, J. (1989) Simultaneous quantitation of salivary carbamazepine, carbamazepine-10, 11-epoxide, phenytoin and phenobarbitone by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 496, 147 – 154.
- Horning, M.G., Brown, L., Nowlin, J., Lertratanangkoon, K., Kellaway, P., y Zion, T.E. (1977). Use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Clinical Chemistry*, 23(2), 157-164.
- Huff, J.S., y Fountain, N.B. (2011). Pathophysiology and definitions of seizures and status epilepticus. *Emergency Medicine Clinics*, 29 (1), 1-13.
- Hülsmeier, V.I., Fischer, A., Mandigers, P.J., DeRisio, L., Berendt, M., Rusbridge, C., y Packer, R.M. (2015). International Veterinary Epilepsy Task Force's current understanding of idiopathic epilepsy of genetic or suspected genetic origin in purebred dogs. *BMC Veterinary Research*, 11 (1), 1-175.
- Klein, B. (2013). *Cunningham, Fisiología veterinaria* (5ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Knott C., y Reynolds F. (1984). The place of saliva in antiepileptic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 6(1), 35-41.
- Lane, S.B., y Bunch, S.E. (1990). Medical management of recurrent seizures in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4(1), 26-39.
- Langman, L.J. (2007). The use of oral fluid for therapeutic drug management: clinical and forensic toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 145-66.
- Lavy, E., Goldberger, D., Friedman, M., y Steinberg, D. (2012). pH Values and Mineral Content of Saliva in Different Breeds of Dogs. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67(4), 244-248.
- Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubieniecki, F., Vazquez, S., D'Giano, C., Sevlever, G., ... Elena, G. (2006). Multidrug-Resistance (MDR) Proteins Develops Refractory Epilepsy

- Phenotype: Clinical and Experimental Evidences. *Current Drug Therapy*, 1(3), 291-309.
- Liu, H., y Delgado, M.R. (1999). Therapeutic Drug Concentration Monitoring Using Saliva Samples: Focus on Anticonvulsants. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(6), 453-70.
- Maldonado, C., Fagiolino, P., Vázquez, M., Rey, A., Olano, I., Eiraldi, R., y Scavone, C. (2008). Therapeutic Carbamazepine (CBZ) and Valproic acid (VPA) Monitoring in Children Using Saliva as a Biologic Fluid. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 14(2), 55-58.
- Montoliu, P. (2012). Crisis epilépticas. En C. Morales y P. Montoliu (Eds.), *Neurología canina y felina* (pp 455-482). Barcelona: Multiméfica Ediciones Veterinarias.
- Montoliu, P., Morales, M., y Fernández, L. (2018). Consideraciones generales sobre el diagnóstico de la epilepsia. *Argos*, 201(201), 36-38.
- Mucklow, J.C., Bacon, C.J., Hierons A.M., Webb, J.K., y Rawlins, M.D. (1981). Monitoring of Phenobarbitone and Phenytoin Therapy in Small Children by Salivary Samples. *Therapeutic Drug Monitoring*, 3(3), 275-7.
- Muñana, K. (2013). Update seizure management in Samall Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(5), 1127-1147.
- Nelson, R., y Couto, C.G. (2010). *Medicina interna en pequeños animales* (4ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Patel, M., Patel, D., Ahir, K., y Singh, S. (2019). A Review: Development and validation of HPLC method. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, 9(3), 173-182.
- Patsalos, P.N., Spencer, E.P., y Berry, D.J. (2018). Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in epilepsy: A 2018 update. *Therapeutic Drug Monitoring*, 40(5), 526-548.
- Patsalos, P. N., y Berry, D.J. (2013). Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs by Use of Saliva. *Saliva Monitoring of Antiepileptic Drugs*, 35(1), 4-29.
- Patterson, E.N.E. (2014). Status epilepticus and cluster seizures. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 44(6), 1103-1112.
- Pellegrino, F.C. (2003). Epilepsia y síndromes epilépticos. En F.Pellegrino, A. Suraniti y L. Garibaldi (Eds.), *El Libro de Neurología para la práctica clínica* (pp 255-280). Buenos Aires: Inter-Médica.
- Pellegrino, F.C. (2020). Epilepsia y síndromes epilépticos. En C.J. Mucha, C.E. Sorribas y F.C. Pellegrino (EdS), *Consulta Rápida en la Clínica Diaria* (2ª ed., pp 443-472). Buenos Aires: Inter-Médica.
- Platt, S., y Olby, N. (2012). *BSAVA Manual of canine and feline neurology* (4ª ed.). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Podell, M. (2013). Antiepileptic Drug Therapy and Monitoring. *Topics in Companion Animal Medicine*, 28(2), 59-66.

- Podell, M., Volk H.A., Berendt, M, Löscher, W., Muñana, K., Patterson, E.E., y Platt, S.R. (2016). 2015 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Seizure Management in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30, 477-490.
- Potschka, H., Fedrowitz, M., y Wolfgang, L. (2002). P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood–brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neuroscience letters*, 327(3), 173-176.
- Potschka, H., Fischer, A., Löscher, W., Patterson, N., Bhatti, S., Berendt, M., ... y Volk, HA. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus proposal: outcome of therapeutic interventions in canine and feline epilepsy. *BMC Veterinary Research*, 11(177), 1-13.
- Rosas Martinez, A., y Peña Baena, E.L. (2016). Epilepsia en perros: revisión de tema. *Ciencia, Tecnología, Sociedad Y Ambiente*, 6(11), 1-14.
- Sernka, T., y Jacobson, E.D. (1981). *Fundamentos de fisiología gastrointestinal*. Barcelona, Reverte.
- Spector, R., Park, G., Johnson, G., y Vessel, E. (1988). Therapeutic drug monitoring. *Clinical pharmacology therapeutics*, 43(4), 345 - 353.
- Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S., y Pavek, P. (2010). Expression and function of P-Glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods in Molecular Biology*, 596, 199-222.
- Thomas, W.B. (2010). Idiopathic epilepsy in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(1), 161-179.
- Tishler, D., Weinberg, K., Hinton, D., Barbaro, N., Annett, G., y Raffel, C. (1995). MDR gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 36(1), 1-6
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Recuperado de [https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation Manual STNAR41 Ebook S .pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf).
- Visser, M. (2018). Techniques for Monitoring Drug Efficacy. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(2), 287-295.
- Volk, H.A. (2015). International Veterinary Epilepsy Task Force consensus reports on epilepsy definition, classification, and terminology, affected dog breeds, diagnosis, treatment, outcome measures of therapeutic trials, neuroimaging and neuropathology in companion animals. *BMC Veterinary Research*, 11(174), 1-2.
- Watanabe, J., Nakase, Y., Urasaki, Y., Havashi, Y., Iwamoto, K., y Ozeki, S. (1981). Protein binding effects on salivary excretion of phenobarbital in dogs. *Journal of Pharmacobio-dinamycs*, 4(12), 968-77.
- Winter, ME. (2010). *Basic Clinical Pharmacokinetics* (5ª ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Yasiry, Z., y Shorvon, S. (2012). How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: The story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. *Epilepsia*, 53(8), 26-39.
- Zimmermann, R., Hülsmeier, V.I., Sauter-Louis, C., y Fischer, A. (2009). Status epilepticus and epileptic seizures in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(5), 970-976.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1

MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FB EN SUERO CANINO

1. OBJETIVO

El objetivo de esta técnica es contar con un procedimiento estandarizado para la cuantificación de FB en suero canino.

2. ALCANCE

Esta metodología incluye al Laboratorio de Farmacología Veterinaria y a todos los ensayos de FB realizados en el Área de Farmacología competente a la especie canina.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria.

Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

MeOH: Metanol HPLC

HPLC: Cromatógrafo líquido de alto rendimiento. (High performance liquid chromatography)

Agua HPLC: Agua miliq filtrada por membrana de 0.45 µm.

FB: Fenobarbital.

CBZ: Carbamazepina.

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de fase móvil Buffer Fosfato 30 mM: pesar 35.8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 20.7 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y llevar a 500 mL con agua destilada. Tomar 60 mL de esta solución y llevarlos a 1 L con agua destilada obteniendo una solución de 30 mM. Ajustar a pH a 6.00 con H_3PO_4 1% de ser necesario.

5.2 Preparación de soluciones

5.2.1 Solución Madre FB Calibración en Metanol (SM FB): Pesar en forma exacta aproximadamente 20 mg de FB, disolver y llevar a 10.0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 2000 mg/l.

5.2.2 Solución de Trabajo 1 FB Calibración en Metanol (ST1 FB): Tomar 3.0 mL de SM de FB y llevar a 10.0 mL con metanol obteniendo una concentración de FB aproximada de 600 mg/L.

5.2.3 Solución de Trabajo 2 FB Calibración en Metanol (ST2 FB): tomar 1.0 mL de ST1 FB con pipeta aforada y colocar en un matraz aforado de 10.0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de FB aproximada a 60 mg/L.

5.2.4 Solución Madre de estándar interno (SM EI CBZ): Pesar en forma exacta aproximadamente 20.0 mg de CBZ, disolver y llevar a 10.0 mL con ACN en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 2000 mg/L.

5.2.5 Solución de trabajo de estándar interno (ST EI CBZ): tomar 100 µL de SM EI CBZ con y colocar en un matraz aforado de 50.0 mL. Llevar a volumen con ACN obteniendo una concentración de CBZ aproximada a 4.0 mg/L.

5.2.6 Soluciones Plasmáticas estándar FB para curva de calibración: a 5.0 mL de suero blanco tomados con pipeta aforada, agregar la cantidad correspondiente de

solución metanólica de calibración indicada en la Tabla 1 utilizando micropipeta. Homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Tabla 1. Soluciones Plasmáticas estándar FB para curva de calibración

Punto	FB		
	Solución	Volumen (μL)	Concentración (mg/mL)
P1	ST1 FB	200.0	79.69
P2	ST1 FB	150.0	58.83
P3	ST1 FB	100.0	39.61
P4	ST1 FB	50.0	20.00
P5	ST2 FB	100.0	1.19

5.3 Tratamiento de muestras

1. A 250.0 μL de muestra plasmática tomada con micropipeta agregar 250.0 μL de solución de trabajo de estándar interno utilizando micropipeta.
2. Agitar con vortex 60 segundos.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a 10°C.
4. Tomar con micropipeta 200.0 μL de la fase orgánica (superior) y transferir a vial de HPLC.
5. Inyectar 50.0 μL en HPLC.

5.4 Condiciones cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000.

Columna: C18 (25 cm x 4.6 mm), tamaño de partícula 5 μm .

Detección: 220 nm.

Fase móvil: Buffer fosfato 30 mM: ACN (65:35).

Flujo: 1 mL/min.

Temperatura de compartimiento de columna: 40 °C

5.5 Tiempos de retención

CBZ ~ 7.5 minutos

FB ~ 5.5 minutos

5.6 Cálculos

Se determinará la concentración de FB utilizando como variable independiente la relación de áreas porcentual que presenten respecto de la CBZ.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

7. REGISTROS

8. DIAGRAMA DE FLUJO

10. MODIFICACIONES

Versión	Fecha	Modificaciones
01	28/02/2022	Primera edición

11. ANEXOS

No aplicable

	ELABORADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
	Catherine Espinosa Micaela Sturchio	Silvana Alvariza	Silvana Alvariza
Fecha	28/02/2022		
Firma			

9.2 Anexo 2

MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FB EN SALIVA CANINA

1. OBJETIVO

El objetivo de esta técnica es contar con un procedimiento estandarizado para la cuantificación de FB en saliva canina.

2. ALCANCE

Esta metodología incluye al Laboratorio de Farmacología Veterinaria y a todos los ensayos de FB realizados en el Área de Farmacología competente a la especie canina.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria.

Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

HPLC: Cromatógrafo líquido de alto rendimiento. (High performance liquid chromatography)

Agua HPLC: Agua destilada filtrada por membrana de 0.45 µm.

FB: Fenobarbital.

CBZ: Carbamazepina.

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de fase móvil Buffer Fosfato 30 mM: pesar 35.8 g de Na₂HPO₄·12H₂O y 20.7 g de NaH₂PO₄·H₂O y llevar a 500 mL con agua destilada. Tomar 60 mL de esta solución y llevarlos a 1 L con agua destilada obteniendo una solución de 30 mM. Ajustar a pH a 6.00 con H₃PO₄ 1% de ser necesario.

5.2 Preparación de soluciones

5.2.1 Solución Madre FB Calibración en Metanol (SM FB): Pesar en forma exacta 20.0 mg de FB, disolver y llevar a 10.0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 2000.0 mg/l.

5.2.2 Solución de Trabajo 1 FB Calibración en Metanol (ST1 FB): tomar 10.0 mL de Metanol con pipeta aforada y colocar en un matraz. Agregar 3.0 ml de SM FB obteniendo una concentración de FB aproximada de 600.0 mg/l.

5.2.3 Solución de Trabajo 2 FB Calibración en Metanol (ST2 FB): tomar 1.0 mL de ST1 FB con pipeta aforada y colocar en un matraz aforado de 10.0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de FB aproximada a 60.0 mg/L. Homogeneizar.

5.2.4 Solución Madre de estándar interno (SM EI CBZ): Pesar en forma exacta aproximadamente 20,0 mg de CBZ, disolver y llevar a 100.0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 200.0 mg/L. Homogeneizar.

5.2.5 Solución de trabajo de estándar interno (ST EI CBZ): tomar 100.0 μ L de SM EI CBZ con micropipeta y colocar en un matraz aforado de 5.0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de CBZ aproximada a 4.0 mg/L. Homogeneizar.

5.1.7 Soluciones en Saliva estándar FB para curva de calibración: a 5.0 mL de saliva blanco tomados con pipeta aforada, agregar la cantidad correspondiente de solución metanólica de calibración indicada en la Tabla 1 utilizando micropipeta. Homogeneizar en vórtex por 60 segundos.

Tabla 1. Soluciones en saliva estándar FB para curva de calibración

Punto	FB		
	Solución	Volumen (μ L)	Concentración (mg/mL)
S1	ST1 FB	200	23.08
S2	ST1 FB	100	11.76
S3	ST1 FB	50	5.96
S4	ST2 FB	200	2.31
S5	ST2 FB	100	1.18

5.2 Tratamiento de muestras

1. A 250 μ L de muestra de saliva tomada con micropipeta agregar 250 μ L de solución de estándar interno utilizando micropipeta.
2. Agitar con vortex 60 segundos.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a 10°C.

- Tomar con micropipeta 200 µL de la fase orgánica (superior) y transferir a vial de HPLC.
- Inyectar 50 µL en HPLC.

5.3 Condiciones cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000.

Columna: C18 (25 cm x 4.6 mm), tamaño de partícula 5 µm.

Detección: 210 nm.

Fase móvil: Buffer fosfato 30 mM: ACN (65:35).

Flujo: 1 mL/min.

Temperatura de compartimiento de columna: 40 °C

5.4 Tiempos de retención

CBZ ~ 7.5 minutos

FB ~ 5.5 minutos

5.5 Cálculos

Se determinará la concentración de FB utilizando como variable independiente la relación de áreas porcentual que presenten respecto de la CBZ.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

7. REGISTROS

8. DIAGRAMA DE FLUJO

10. MODIFICACIONES

Versión	Fecha	Modificaciones
01	28/02/2022	Primera edición

11. ANEXOS

No aplicable

	ELABORADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
	Catherine Espinosa Micaela Sturchio	Silvana Alvariza	Silvana Alvariza
Fecha	28/02/2022		
Firma			