

Determinación del curso temporal de fluoxetina y norfluoxetina en perros Pastor Alemán y Akita Inu

Temporary course of fluoxetine and norfluoxetine in German Shepherd and Akita Inu dogs

Christian Tapia A.^{1,3}, Elizabeth Tapia T.³, Nicol Millahueque S.¹, Carolina Ríos P.², Gonzalo Chávez C.^{1,4}

RESUMEN

Se evaluó la farmacocinética de la fluoxetina en dos razas de perros filogenéticamente distantes. Para lograrlo, se puso a punto y validó el método de cuantificación donde se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) para cada punto. Los valores del CV fueron del orden del 2%. El límite de detección fue de 3.36 ng/ml y correspondió a tres veces la señal ruido de la muestra blanco. El límite de cuantificación (LOQ) fue de 10.53 ng/ml. El análisis cromatográfico indicó que a las dos horas de la administración se alcanzaron las máximas concentraciones de fluoxetina (Akita Inu: 41.8±0.6 ng/ml; Pastor Alemán: 45.3±1.4.0 ng/ml), mientras que las concentraciones mínimas se alcanzaron a las 80 horas (Akita Inu: 3.9±0.1 ng/ml; Pastor Alemán: 3.9±0.1 ng/ml). Solo se encontró diferencia significativa entre razas en los valores alcanzados a las 2 h pos-administración ($p<0.05$). Se puede presumir que, debido a las diferencias en la curva temporal, el manejo farmacológico podría ser diferente entre razas filogenéticamente diferentes.

Palabras clave: fluoxetina, norfluoxetina, curso temporal, comportamiento, etología clínica

¹ Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Viña del Mar, Chile

² Dirección Académica, Universidad Santo Tomás, Los Ángeles, Chile

³ Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Andrés Bello, Viña del Mar, Chile

⁴ E-mail: gchavez@santotomas.cl

Recibido: 13 de marzo de 2020

Aceptado para publicación: 17 de octubre de 2020

Publicado: 21 de diciembre de 2020

ABSTRACT

The pharmacokinetics of fluoxetine were evaluated in two phylogenetically distant dog breeds. The quantification method was fine-tuned and validated through the mean, standard deviation and coefficient of variation (CV) for each sampling point. The CV values were around 2%. The detection limit was 3.36 ng/ml and corresponded to three times the signal noise of the blank sample. The limit of quantification (LOQ) was 10.53 ng/ml. The chromatographic analysis indicated that the maximum concentrations of fluoxetine were reached at two hours post-administration (Akita Inu: 41.8 ± 0.6 ng/ml; German Shepherd: $45.3 \pm 1.4.0$ ng/ml), while the minimum concentrations were reached at 80 hours (Akita Inu: 3.9 ± 0.1 ng/ml; German Shepherd: 3.9 ± 0.1 ng/ml). A significant difference between breeds was only found in the values reached at 2 h post-administration ($p < 0.05$). Results may indicate that due to the differences in the time curve, drug management might be different between phylogenetically different breeds.

Key words: fluoxetine, norfluoxetine, time course, behaviour, clinical ethology

INTRODUCCIÓN

La fluoxetina es un potente inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS) que actúa en el SNC, ampliamente utilizada en humanos, entre otros, para tratar depresión y trastorno obsesivo compulsivo (TOC) (Gram, 1994). Su empleo en perros se encuentra ampliamente documentado para el tratamiento de diversos tipos de agresividad, miedo y TOC (Fleischer *et al.*, 2008). Esta droga se metaboliza, principalmente, por N-desmetilación, dando lugar a la formación de norfluoxetina, metabolito que tiene mayor vida media y similar potencia que la fluoxetina (von Moltke *et al.*, 1997). Esta metabolización se lleva a cabo a través de diversas isoenzimas del citocromo P450 (CYP450), siendo también capaz de inhibir su propia actividad. Estas características permiten asumir que la disposición de la droga y su metabolismo estereoselectivo están asociadas con diferentes respuestas, dependiendo de los polimorfismos que presenten las isoenzimas involucradas.

Diversos estudios han mostrado que las isoenzimas CYP2C9 y CYP2C19 juegan un importante rol en la N-desmetilación de la fluoxetina (Liu *et al.*, 2001ab). A pesar del aumento en investigación sobre farmacogenética en humanos, existe una limitada investigación a este respecto en animales; no obstante, se han reportado diferencias raciales dentro de algunas especies domésticas como respuesta a sustancias exógenas y endógenas (Fleischer *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta la importancia de conocer la correlación entre las características fenotípicas, genéticas y la respuesta a medicamentos, la *Animal Pharmaceutics and Technology Focus Group* de la *American Association of Pharmaceutical Scientists* (AAPS – www.aps.org), viene realizando trabajos sobre la fisiología y el metabolismo de distintas razas que podrían influir tanto en el uso de perros como en modelos animales, así como en el desarrollo de drogas para su uso en ellos.

De acuerdo con los antecedentes que evidencian la gran diversidad genética existente, no es sorprendente que haya diferencias metabólicas y fisiológicas que puedan influir no solo en la propensión a ciertas enfermedades, sino además, en la farmacocinética de diversas drogas y, por ende, en su respuesta farmacológica (Egenvall *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2007). Teniendo presente que se ha logrado establecer el mapa genómico para un número importante de razas (Ostrander y Wayne, 2005; Parker y Ostrander, 2005), junto con la evidencia de que las diferencias metabólicas entre razas afectarían la farmacocinética y farmacodinamia de las drogas, es prudente pensar que en el caso de la fluoxetina, la velocidad de absorción, el curso temporal de la concentración plasmática y, por ende, su biodisponibilidad, deberían mostrar diferencias al ser administrada entre razas de perro. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar posibles diferencias en el curso temporal de la fluoxetina entre dos razas de perros filogenéticamente distantes entre ellas, Akita inu y Pastor alemán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y Animales

El estudio se desarrolló en la ciudad de Viña del Mar, Región de Valparaíso, Chile, entre los años 2017 y 2019.

Como criterios de inclusión se consideraron a perros de las razas Akita inu y Pastor alemán, machos y hembras, entre 1 y 4 años de edad, intactos o castrados, con apropiada funcionalidad hepática y renal, alimentados con extruido que cumpliera con los requerimientos de la Asociación de Oficiales Americanos Controladores de Alimentos (AAFCO – por su sigla en inglés), ajustados al estándar de la raza de acuerdo a lo dispuesto por la Federación Cinológica Internacional (FCI), y con certificado de inscripción del Kennel Club

de Chile. Además, no debían presentar trastornos de conducta, condición que debía ser evaluada por un médico veterinario especializado en etología clínica. Fueron excluidos del estudio perros que estuvieran recibiendo tratamiento farmacológico, que presentaran enfermedad renal o hepática, aguda o crónica, enfermedad digestiva, epilépticos, cardiopatas, diabéticos, con problemas de nutrición, dislipidemia, hipercatabólicos o con secuelas de una infección masiva, alérgicos al principio activo considerado en este estudio y hembras en celo.

Consideraciones Éticas

Una vez seleccionado el paciente, se sostuvo una entrevista presencial con el tutor responsable del perro, para invitarlo a participar de la investigación. Se le solicitó la firma de un consentimiento informado, documento ajustado a las recomendaciones de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT). Se consideraron, además, las indicaciones de la Ley 20.380 sobre protección de los animales (Ley 20.380, 2009). Asimismo, el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Científico Institucional, de la Universidad Santo Tomás (CEC – UST 05/2017).

Procedimiento

En una fase inicial y con base a los criterios indicados, se seleccionaron 10 perros Akita inu y 10 Pastor alemán. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo con las recomendaciones de la *Food and Drug Administration* (FDA, 2016) sobre estudios de bioequivalencia, donde se plantea que para que un estudio sea aceptado internacionalmente se requiere de un mínimo de seis individuos. Sin embargo, considerando la posibilidad de que durante el estudio ocurrieran bajas por muerte, enfermedad o retiro voluntario de la investigación por parte del tutor del perro, se incluyeron 10 individuos por cada grupo.

A cada perro se le realizó hemograma (hematocrito, recuento de eritrocitos, medición de hemoglobina, índices de Wintrobe, recuento de reticulocitos [en caso de anemia], recuento de plaquetas y estudio microscópico de frotis), perfil bioquímico (proteínas totales, albúmina, creatinina, nitrógeno ureico en sangre [NUS], glucosa, fosfatasa alcalina [FA], alanina transaminasa [ALT], aspartato aminotransferasa [AST], gamma-glutamyl transpeptidasa [GGT], bilirrubina total, bilirrubina indirecta, bilirrubina directa, Ca y P) y perfil lipídico (colesterol, triglicéridos, -lipoproteínas de alta densidad [HDL] y -lipoproteínas de baja densidad [LDH]). Las muestras fueron analizadas en un contador hematológico HumanCount 30^{TS} y en un analizador bioquímico automatizado Landwind LW C100.

En la segunda fase, una vez comprobada la elegibilidad de los perros, se indicó un ayuno de 12 horas pre-administración de fluoxetina (Prozac®) y de 6 horas pos-administración, a razón de 1 mg/kg vía oral en dosis única (DL50 en perros – 100 mg/kg). Posteriormente, se tomaron muestras de sangre en tubos sin anticoagulante al tiempo 0 (previo a la medicación) y 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 y 80 horas pos-administración. Las primeras siete muestras (0-24 horas) se obtuvieron con el paciente internado en el Hospital Escuela y las dos últimas en el domicilio de los pacientes. Las muestras fueron centrifugadas a 1800 g en centrífuga refrigerada, el plasma sanguíneo fue almacenado a -20 °C hasta efectuar las determinaciones mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Ffluoxetina y Norfluoxetina

Se realizó la prueba de aptitud del sistema HPLC en el Laboratorio de Ciencias Farmacéuticas de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile. Los parámetros para evaluar, luego del análisis de una solución estándar en quintuplicado, fueron: tiempo de retención, factor de capacidad, platos teóricos, factor de asimetría y resolución.

Los estándares primarios de fluoxetina y norfluoxetina fueron adquiridos a Sigma® (USA). Las soluciones se prepararon en agua calidad Milli-Q. Las soluciones stock de las drogas y sus metabolitos fueron preparadas en metanol calidad HPLC, almacenadas a -20 °C y utilizadas en un plazo no mayor a un mes de su preparación.

Se utilizó un equipo HPLC Shimadzu (UFLC Prominence LC-20), con unidad desgasificadora (DGU-20 A 5R), unidad de entrega de solvente (LC-20AD), unidad de autosampler (SIL-20AC HT), horno (CTO-20AC), lectores (SPD-20 AV /UV VIS detector y RID-10A / *refractive index detection*) y *communication bus module* (CBM). La fase móvil utilizada fue la mezcla de acetonitrilo, agua y trietilamina en una proporción 480:500:20, ajustada a pH 4.7 con ácido fosfórico. Los análisis se realizaron en el laboratorio BioTecnos®, laboratorio asociado al Centro de Innovación de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Disoluciones de trabajo

A partir de una disolución patrón de 1 mg/ml para cada compuesto, se prepararon soluciones de trabajo a concentraciones de 100 µg/ml en metanol. Estas fueron utilizadas para la elaboración diaria de las disoluciones necesarias para cubrir el rango de concentraciones estudiado.

Preparación de muestras de plasma

Para cada muestra de sangre se utilizó una alícuota de 1 ml, a la que se adicionó 80 µl de clomipramina (1 mg/l) como estándar interno. Se mezclaron durante 3 min con vortex, con 4 ml de solución acetonitrilo al 20% y se llevó a 10 ml con acetonitrilo (100%). La mezcla fue centrifugada a 1000 g durante 15 min y filtrada a través de filtros Milli-pore de 0.45 µm.

Validación de la técnica analítica

De acuerdo con las directrices de la FDA, se estudió la linealidad, repetibilidad y reproducibilidad, rendimiento, límite de cuantificación y supresión iónica (FDA, 2014). Se utilizó el programa estadístico R-studio para determinar el *system suitability test* y la linealidad del sistema.

Validación del Método Analítico

- *Especificidad.* Se realizaron pruebas cromatográficas para mostrar que los tiempos de retención del analito de interés no presentaba interferencias con las señales endógenas del plasma.
- *Linealidad.* El rango de concentraciones de fluoxetina trabajado fue entre 10 y 300 ng/ml.
- *Exactitud y precisión.* Se obtuvo realizando una cuantificación del analito en plasma fortificado con fluoxetina y clomipramina en concentraciones conocidas. La relación de área se ingresó en la curva de calibración para obtener un valor para concentración. Este valor se comparó con el valor real de concentración. La medición se realizó por triplicado y en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto). Para determinar la precisión del método se calculó el promedio, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para cada punto.
- *Límite de cuantificación (LOQ).* Menor punto del rango de concentración utilizado para establecer la linealidad del método si la precisión del LOQ es menor al 20% y la exactitud se encuentra dentro de un rango de $\pm 20\%$.
- *Recuperación del proceso de extracción.* Se realizó cuantificación del analito en plasma y solución stock en concentraciones conocidas. Las muestras de plasma se sometieron al proceso de extracción descrito para el método. La medición se realizó por triplicado y en

tres niveles de concentración (bajo, medio y alto). Se comparó la relación de área obtenida en las muestras de plasma respecto a las obtenidas en las muestras soluciones stock.

- *Límite de detección.* Menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada con exactitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del Método Analítico

- *Linealidad.* Se encontró una alta correlación entre las razones de área de los picos de fluoxetina y clomipramina (Cuadro 1).
- *Exactitud y precisión.* Los valores del coeficiente de variación fueron del orden del 2%.
- *Límite de cuantificación.* El LOQ fue de 10.53 ng/ml.
- *Recuperación del proceso de extracción.* Los valores obtenidos para el porcentaje de recuperación fueron, en promedio, de 75%.
- *Límite de detección.* Se alcanzó a los 3.36 ng/ml.

Análisis Sanguíneos

Se observaron diferencias significativas en 14 analitos (45.2%). En el hemograma, 72.7% de los analitos presentaron diferencias significativas entre razas (hemoglobina, hematocrito, VCM, CHCM, leucocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos) (Cuadro 2); en el perfil bioquímico, ocurrió en el 31.2% de los analitos (globulina, relación albúmina/globulina, NUS y Ca) (Cuadro 3) y en el perfil lipídico solo se observó en el LDL (Cuadro 4).

Los resultados reafirman la necesidad de desarrollar una línea de investigación respecto de los fenotipos bioquímicos para las diferentes razas de perro, ya que estas diferencias permiten presumir posibles diferen-

Cuadro 1. Coeficiente de regresión lineal entre fluoxetina y clomipramina, concentraciones de fluoxetina entre 10 y 300 ng/ml

Concentración (ng/ml)	Área fluoxetina (mAU)	Área clomipramina (mAU)	RA
10	467,709	45,383,457	0.010
50	3,453,745.333	42,721,672.33	0.081
100	6,650,663	44,102,003.33	0.151
150	10,242,587.67	45,023,737.33	0.227
200	13,101,630.67	44,054,081	0.297
250	16,593,985.33	43,748,307	0.379
300	20,381,481.33	44,803,477.67	0.455

Los resultados muestran una alta correlación entre las razones de área de los picos de fluoxetina y clomipramina (estándar interno), como lo demuestra el coeficiente de regresión lineal obtenido: $r=0.9995$

Cuadro 2. Resultados del hemograma en perros de las razas Pastor Alemán y Akita inu

	Pastor alemán		Akita inu		p	Valor ¹ referencial
	Prom ± DE	Min – Max	Prom ± DE	Min – Max		
Eritrocitos, $\times 10^6/\mu\text{l}$	6.98 ± 0.44	6.27-7.63	6.67 ± 0.78	5.56-8.35	0.30	4.95-7.87
Hemoglobina, g/dl	15.77 ± 1.31	13.4-18.15	12.88 ± 1.147	11.4-15.2	<0.01	12-19
Hematocrito, %	47-39 ± 3.51	41.2-53.36	36.98 ± 4.69	27.6-44.7	<0.01	37-57
VCM, fL	67.9 ± 1.94	65-71	43.59 ± 21.22	13-61.2	<0.01	60-77
CHCM, g/dl	33.25 ± 0.66	32.4-34	33.9 ± 0.09	33.8-34	<0.01	32-36.3
Leucocitos, μl	15,377 ± 3,354	11,790–22,780	9,668 ± 2,027	6,520-12,810	<0.01	5,000-14,000
Neutrófilos segmentados, μl	8,088 ± 1,882	5,940-12,629	5,712 ± 1,833	3,260-8,967	0.01	3,000-12,000
Linfocitos, μl	4,024 ± 1,932	1,919-7,289	3,071 ± 946	2,005-4,848	0.18	400-2,900
Monocitos, μl	1,074 ± 523	153-1,645	292 ± 163	81-692	<0.01	100-1,400
Eosinófilos, μl	1,862 ± 1,243	685-5,011	509 ± 492	0-1,271	<0.01	100-1,300
Plaquetas, $10^3/\mu\text{l}$	315.5 ± 120.3	105-546	288.3 ± 83.1	209-461	0.56	200-600

VCM: volumen corpuscular medio; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media
¹ Latimer (2011)

Cuadro 3. Resultados del perfil bioquímico en perros de las razas Pastor Alemán y Akita inu

	Pastor alemán		Akita inu		P	Valor ¹ referencial
	Prom ± DE	Min – Max	Prom ± DE	Min – Max		
Proteína total, g/dl	6.81 ± 0.65	6.1-8.3	6.27 ± 0.60	5.0-7.0	0.06	5.4-7.5
Albúmina, g/dL	3.29 ± 0.34	2.7-3.8	3.64 ± 0.27	3.1-4	0.02	2.3-3.1
Globulinas, g/dl	3.52 ± 0.79	2.7-5.6	2.63 ± 0.40	1.9-3.1	<0.01	2.7-4.4
Relación A/G g/dl	0.98 ± 0.23	0.48-1.33	1.41 ± 0.19	1.21-1.76	<0.01	0.6-1.1
Creatinina, mg/dl	1.10 ± 0.26	0.5-1.5	1.14 ± 0.15	0.9-1.3	0.68	0.5-1.4
NUS, mg/dl	22.34 ± 7.01	13-38	14.10 ± 3.00	10.0-18	<0.01	8-28
Bilirrubina total, g/dl	0.37 ± 0.10	0.21-0.49	0.26 ± 0.11	0.1-0.4	0.90	0.1-0.3
Bilirrubina directa, mg/dl	0.14 ± 0.08	0.06-0.32	0.09 ± 0.04	0.03-0.13	0.06	<0.3
Bilirrubina indirecta, mg/dl	0.23 ± 0.12	0.08-0.43	0.18 ± 0.07	0.07-0.27	0.25	0-0.3
FA, U/L	118.8 ± 49.92	58-213	115.9 ± 47.1	72-212	0.90	20 - 155
ALT, U/l	43.50 ± 14.39	22-74	56.3 ± 22.05	27-110	0.14	10-109
AST U/l	30.70 ± 6.38	22-39	35 ± 11.50	22-52	0.31	13-37
GGT, U/l	6.06 ± 2.08	1.8-8.9	5.27 ± 0.91	3.9-6.6	0.29	5-25
Glucosa, mg/dl	74 ± 16.15	44-102	83.50 ± 10.14	66-99	0.13	75-120
Calcio, mg/dl	9.12 ± 1.24	7.2-10.9	10.19 ± 0.99	8.5-11.9	0.04	9.1-12
Fósforo, mg/dl	4.7 ± 0.85	3.6-5.9	4.26 ± 0.62	3.3-5.4	0.20	2.9-7.9

Relación A/G: relación albúmina /globulina; NUS: nitrógeno ureico en sangre; FA: fosfatasa alcalina; ALT: alanina transaminasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa

¹ Latimer (2011)

cias en la farmacogenética. Estas divergencias interraciales coinciden con lo postulado por Infante *et al.* (2015), quienes explican que puede haber casos de no homogeneidad genética dentro del mismo grupo racial debido a los polimorfismos genéticos. Si se toman en cuenta estas diferencias, sería un paso más en los avances de la medicina veterinaria, considerando la evidencia de estudios que

consideran diferencias entre razas, edad, sexo, estado reproductivo y tamaño del animal (Sharkey *et al.*, 2009; Rosset *et al.*, 2012; Lawrence *et al.*, 2013; Brenten *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2016).

Tal y como lo plantean Lavoué *et al.* (2013), hay razas que se beneficiarían con intervalos de referencia específicos. Un ejem-

Cuadro 4. Resultados del perfil lipídico en perros de las razas Pastor Alemán y Akita inu

	Pastor alemán		Akita inu		P	Valor ¹ referencial
	Prom ± DE	Min – Max	Prom ± DE	Min – Max		
Colesterol total, mg/dl	248.8 ± 57.6	165-339	221 ± 43.6	173-292	0.25	135-278
HDL, mg/dl	164.87 ± 43.36	106-238	161.4 ± 33.8	117-221	0.84	89-149
LDL, mg/dl	69.47 ± 24.71	35-112	47.20 ± 12.80	33-71	0.02	20-60
Triglicéridos, g/dl	60.9 ± 27.3	34-124	65.70 ± 27.93	35-125	0.70	40-169

HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad

¹ Latimer (2011)

Cuadro 5. Concentraciones plasmáticas de fluoxetina (promedio ± DE, ng/ml) por raza de perros

Horas	Akita inu	Pastor alemán	p
0	0	0	0
1	14.1 ± 0.1	12.9 ± 0.1	0.09
2	41.8 ± 0.6	45.3 ± 1.4	0.03
3	12.3 ± 1.0	11.9 ± 0.9	0.77
6	9.3 ± 0.1	9.8 ± 0.3	0.14
12	7.9 ± 0.1	8.0 ± 0.3	0.59
24	6.7 ± 0.3	7.5 ± 0.2	0.01
48	5.8 ± 0.3	5.3 ± 0.2	0.30
80	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1	0.91

La concentración máxima se observó a las 2 horas y la mínima a las 80 horas

plo es el Akita inu y la microcitosis marcada observada en el estudio. Según Rizzi *et al.* (2010), de no conocerse las características bioquímicas de cada raza, los médicos veterinarios podrían realizar tratamientos farmacológicos para contrarrestar una anomalía que realmente no es tal. Otro ejemplo

podría ser la monocitosis y eosinofilia en el 40 y 60% de los pastores alemanes, respectivamente, encontrados en el estudio, lo que sugeriría una característica de la raza, tomando en cuenta que la totalidad de los perros muestreados se encontraban clínicamente sanos al momento del estudio.

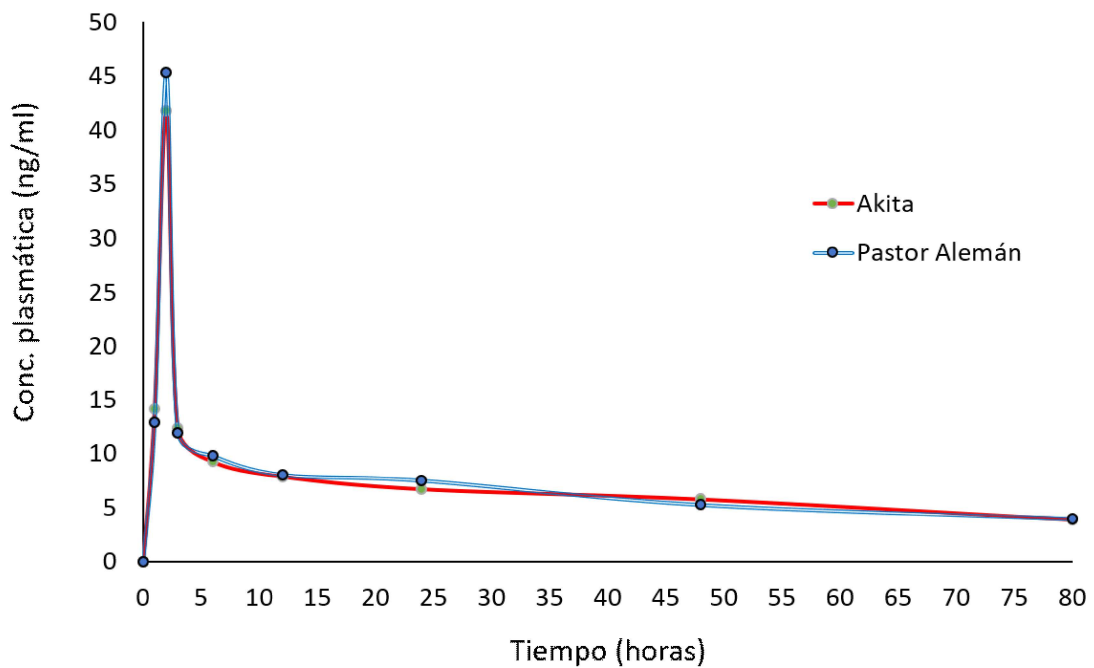


Figura 1. Curva concentración promedio de fluoxetina versus tiempo

Análisis Cromatográfico

De los 20 perros incluidos en el estudio, solo 12 llegaron al final de la segunda etapa de la investigación y 11 la concluyeron satisfactoriamente. A través de análisis de los resultados analíticos de las concentraciones plasmáticas de fluoxetina por raza y por individuo se construyó la curva promedio de concentraciones plasmáticas de fluoxetina versus el tiempo transcurrido desde la administración del fármaco hasta las 80 horas.

Las concentraciones máximas se obtuvieron a las 2 horas en ambas razas (Cuadro 5, Figura 1), habiendo diferencia significativa entre razas ($p < 0.05$). Este resultado es relevante, dado que, en la práctica clínica, las posologías son definidas indistintamente de la raza en la práctica clínica. De otra parte, considerando el límite de detección y de cuantificación del método, las concentraciones mínimas se observaron a las 80 horas en ambas razas.

CONCLUSIONES

- Se puede presumir que, debido a las diferencias en la curva temporal de fluoxetina, el manejo farmacológico debería ser diferente entre razas filogenéticamente diferentes.
- A partir de los resultados observados, se debería prestar atención a la necesidad de actualizar los intervalos de referencia establecidos para la especie canina, especialmente, en grupos filogenéticos de razas de perros.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado a través de la adjudicación de fondos del Concurso Interno de Proyectos de Investigación, Creación e Innovación Tecnológica, de la Vicerrectoría Académica de Investigación y Postgrado de la Universidad Santo Tomás, Chile (Código O000028274).

LITERATURA CITADA

1. **Brenten T, Morris PJ, Salt C, Raila J, Kohn B, Schweigert FJ, Zentek J. 2016.** Age-associated and breed-associated variations in haematological and biochemical variables in young Labrador Retriever and miniature Schnauzer dogs. *Vet Rec Open* 3: e000166. doi: 10.1136/vetreco-2015-000166
2. **Chang Y, Hadox E, Szladovits B, Garden O. 2016.** Serum biochemical phenotypes in the domestic dog. *Plos One* 11: e0149650. doi: 10.1371/journal.pone.0149650
3. **Egenvall A, Bonnett BN, Shoukri M, Olson P, Hedhammar A, Dohoo I. 2000.** Age pattern of mortality in eight breeds of insured dogs in Sweden. *Prev Vet Med* 46: 1-14. doi: 10.1016/s0167-5877(00)00135-5
4. **Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander EA, Martinez M. 2008.** Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. *AAPS J* 10:110-119. doi: 10.1208/s12248-008-9011-1
5. **[FDA] Food and Drug Administration. 2014.** Guidance for industry. bioavailability and bioequivalence. Studies submitted in NDAs or INDs — General considerations. [Internet]. Available in: <https://www.fda.gov/media/88254/download>
6. **[FDA] Food and Drug Administration. 2016.** Guidance for industry bioequivalence: blood level bioequivalence study - VICH gl52. [Internet]. Available in: <https://www.fda.gov/media/89840/download>
7. **Gram LF. 1994.** Fluoxetine. *New Engl J Med* 231: 1353-1361. doi: 10.1056/NEJM199411173312008
8. **Infante J, Bernal Y, Acosta E, Gómez L, Torres O. 2015.** Estudio preliminar de la diversidad genética de perros con fenotipo Poodle en Colombia usando microsatélites. *Arch Zootec* 64: 303-306. doi: 10.21071/az.v64i247.412
9. **Latimer K. 2011.** Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology. 5th ed. Wiley-Blackwell. 528 p.
10. **Lavoué R, Geffre A, Braun JP, Peeters D, Trumel C. 2013.** Breed-specific biochemical reference intervals for the adult Dogue de Bordeaux. *Vet Clin Path* 42: 346-359. doi: 10.1111/vcp.12067.
11. **Lawrence J, Chang Y-MR, Szladovits B, Davison LJ, Garden OA. 2013.** Breed-specific hematological phenotypes in the dog: a natural resource for the genetic dissection of hematological parameters in a mammalian species. *Plos One* 8: e81288. doi: 10.1371/journal.pone.0081288
12. **Ley 20380. 2009.** Sobre protección de animales. Ministerio de Salud; Subsecretaría de Salud Pública. Gobierno de Chile. Chile. [Internet]. Disponible en: <https://www.leychile.cl/N?i=1006858&f=-2017-08-02&p=>
13. **Liu ZQ, Cheng ZN, Huang SL, Chen XP, Ou-Yang DS, Jiang CH, Zhou HH. 2001a.** Effect of the CYP2C19 oxidation polymorphism on fluoxetine metabolism in Chinese healthy subjects. *Brit J Clin Pharmacol* 52: 96-99. doi: 10.1046/j.0306-5251.2001.01402.x
14. **Liu ZQ, Shu Y, Huang SL, Wang LS, He N, Zhou HH. 2001b.** Effect of the CYP2C19 genotype and CYP2Cq on fluoxetine N-demethylation in human liver microsomes. *Acta Pharmacol Sin* 22: 85-90.

15. **Ostrander EA, Wayne RK. 2005.** The canine genome. *Genome Res* 15:1706-1716. doi: 10.1101/gr.3736605
16. **Parker HG, Ostrander EA. 2005.** Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genet* 1: e58 doi: 10.1371/journal.pgen.0010058
17. **Parker HG, Kukekova AV, Akey DT, Goldstein O, Kirkness EF, Baysac KC, Mosher DS, et al. 2007.** Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res* 17: 1562-1571. doi: 10.1101/gr.6772807
18. **Rizzi TE, Clinkenbeard KD, Meinkoth JH. 2010.** Normal hematology of the dog. In: Weiss DJ, Wardrop J (eds). *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Iowa: Wiley-Blackwell. p 801-802.
19. **Rosset E, Rannou B, Casseleux G, Chalvet K, Buff S. 2012.** Age-related changes in biochemical and hematologic variables in Borzoi and Beagle puppies from birth to 8 weeks. *Vet Clin Path* 41: 272-282. doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.-00415.x
20. **Sharkey L, Gjevre K, Hegstad-Davies R, Torres SH, Muñoz C.** Breed-associated variability in serum biochemical analytes in four large-breed dogs. *Vet Clin Path* 38: 375-380. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00134.x
21. **von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, Eugene Wright JSC, Harmatz JS, Shader RI. 1997.** Human cytochromes mediating N-demethylation of fluoxetine in vitro. *Psychopharmacol* 32: 402-407. doi: 10.1007/s002130050362