



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Estudio de disolución biorrelevante *in vitro* y modelado
farmacocinético *in silico* de formulaciones de furosemide para terapia
cardiovascular de administración oral en perros.**

Cristian Marcelo Valiante Unanua

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de:

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Octubre de 2022.

**Estudio de disolución biorrelevante *in vitro* y modelado
farmacocinético *in silico* de formulaciones de furosemide para terapia
cardiovascular de administración oral en perros.**

Tribunal:

Dra. Beatriz Munguía

Dr. Alejandro Benech

Dr. Marcos Ferrante

Dr. Gonzalo Suárez, Director

Dr. Manuel Ibarra, Director

Dra. Silvana Alvariza, Director

Agradecimientos

A la Universidad de la República por garantizar una formación de calidad, gratuita e integral en la República Oriental del Uruguay.

A los programas de posgrado de Facultad de Química y PEDECIBA Química.

A la Comisión Académica de Posgrado (C.A.P.) por la beca que me permitió realizar mis trabajos de maestría de la mejor forma posible.

A las Guardia Republicana del Uruguay por permitirnos trabajar con el Plantel de Perros de la Unidad Táctica K9 y a los veterinarios Ana y Enrique de dicha dependencia por acompañarnos a mis tutores y a mi en los ensayos clínicos.

A mis tutores de maestría Gonzalo, Manuel y Silvana, por acompañarme y guiarme en todo este proceso nuevo para mi y hacer posible la conclusión de esta etapa.

A todos mis compañeros de trabajo del laboratorio de farmacología en Facultad de Veterinaria (LAFAVET) por compartir mañanas y tardes con la buena energía de siempre.

Al CEBIOBE (Facultad de Química, UdelaR) por brindarme un espacio para trabajar en forma coordinada y a María Luisa por ayudarme con las tareas nuevas y compartir el trabajo a la par.

A mi familia por los valores que me transmitieron durante toda mi vida y por el apoyo que me han dado durante todos mis años de estudio.

A mi gurí gordo, compañero de vida, por siempre apoyarme y darme el empujón que se necesita en los momentos buenos y no tan buenos del proceso.

A mis amigos, que más cerca o más lejos, siempre estuvieron presentes.

**Estudio de disolución biorrelevante *in vitro* y modelado
farmacocinético *in silico* de formulaciones de Furosemide para terapia
cardiovascular de administración oral en perros.**

Cristian Marcelo Valiante Unanua, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Año 2022

Directores de Tesis: Gonzalo Suárez (G3 PEDECIBA Química, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República), Manuel Ibarra (G3 PEDECIBA Química, Facultad de Química, Universidad de la República), Silvana Alvariza (G3 PEDECIBA Química, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República).

Resumen

En el presente trabajo de tesis de maestría se realiza una aproximación al estudio farmacocinético de formulaciones orales del fármaco furosemide utilizadas en la terapia cardiológica en medicina veterinaria en nuestro país para la administración por vía oral en perros, desde un enfoque de la farmacometría como disciplina cuantitativa y aplicada que nos permite desarrollar modelos computacionales para predecir la cinética del fármaco en la especie estudiada. Se plantea desarrollar un modelo *in silico* que represente

los procesos de liberación, absorción, distribución y eliminación de furosemide con acción sobre el sistema cardiovascular en perros, integrando la información vinculada a las formulaciones de uso veterinario presentes en el mercado uruguayo, el principio activo en cuestión y la especie de interés. Las formulaciones son en primer lugar evaluadas mediante ensayos de disolución *in vitro* en aparato disolutor USP II utilizando medios de disolución biorrelevantes citados por la Organización Mundial de la Salud y adaptadas según las condiciones fisiológicas normales del tracto gastrointestinal del canino siguiendo las guías de estudios de bioequivalencia para productos veterinarios del Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento, en el marco de modelos farmacocinéticos basado en la fisiología de la especie. Los ensayos de disolución fueron complementados por ensayos de desintegración de cada una de las formulaciones orales en estudio. La integración de esta información en modelos PBPK (*Physiologically-Based Pharmacokinetic*) se utilizó para evaluar el rendimiento relativo entre formulaciones disponibles en cuanto a la exposición provocada al fármaco, simulando ensayos de intercambiabilidad virtual. La aplicación del enfoque *in vitro-in silico-in vivo* se presenta como una alternativa interesante para abordar y reducir la variabilidad de los productos farmacéuticos en calidad biofarmacéutica, principalmente en países en vías de desarrollo en los cuales no se requiere bioequivalencia demostrada y menos aún en formulaciones utilizadas en medicina veterinaria. La contrastación del modelo *in silico* fue realizada con un muestreo farmacocinético en perros sanos a los cuales se les administró en forma cruzada las dos presentaciones de furosemide disponibles en el mercado uruguayo en forma de comprimidos para administración por vía oral. La cuantificación de la concentración del fármaco en sangre se realizó a través un método analítico validado por sistema HPLC-FLD. Los datos *in vivo* de concentraciones plasmáticas fueron utilizados para contrastar el modelo computacional y así poder evaluar

diferencias significativas entre formulaciones de furosemide de uso veterinario utilizadas y comercializadas en plaza. El modelo se optimizó incluyendo un aumento dependiente de la concentración en el flujo sanguíneo renal con impacto sobre la excreción renal de furosemide, un proceso de secreción tubular activa del fármaco a nivel renal siguiendo una cinética de Michaelis-Menten y un tiempo de latencia aplicado al inicio del efecto de la vasodilatación renal. Los perfiles de disolución de dos productos locales obtenidos en condiciones biorrelevantes se ajustaron con un modelo de gompertz y se incluyeron en el modelo PBPK para estudiar el rendimiento relativo de las formulaciones bajo un enfoque PBBM (*Physiologically-Based Biopharmaceutics Modeling*) utilizando los software PK-Sim® y MoBi®. El área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo de cero a infinito (AUC_{0-inf.}) y la concentración máxima de fármaco (C_{max}) fueron predichas por el modelo con un sesgo relativo inferior al 20% para ambas formulaciones. El cociente test/referencia predicho en la simulación en perros (n=1000) fue de 0.156 para AUC_{0-inf.} (90 % CI 0.102-0.249) y 0.146 para C_{max} (90 % CI 0.105-0.202), mientras que los resultados observados en el ensayo *in vivo* fueron 0.148 para AUC_{0-inf.} (CI 90% 0.106-0.208) y 0.163 para C_{max} (CI 90% 0.103-0.256). El modelo PBPK desarrollado fue capaz de predecir adecuadamente la farmacocinética de furosemide y el rendimiento relativo entre los productos veterinarios estudiados en perros. Las formulaciones no resultaron bioequivalentes de acuerdo al ensayo de bioequivalencia en perros sanos y acorde a la simulación o ensayo de bioequivalencia virtual. El modelo farmacocinético desarrollado en esta investigación podrá ser utilizado a futuro en la evaluación de otros productos de furosemide en el mercado farmacéutico que pretendan ser utilizados en perros tanto por autoridades reguladoras como por laboratorios farmacéuticos y también en el desarrollo de productos bioequivalentes respecto a la formulación de referencia haciendo dicho proceso más eficiente. El enfoque PBBM

predijo adecuadamente la farmacocinética de furosemida y el rendimiento relativo del producto en perros, demostrando ser una herramienta efectiva y alternativa al ensayo clínico que puede realizar predicciones con un adecuado nivel de confianza y requerimientos marcadamente inferiores de infraestructura y recursos de investigación en las áreas de investigación, desarrollo y regulación de productos farmacéuticos veterinarios.

***In vitro* biorelevant dissolution and *in silico* pharmacokinetic modeling
of Furosemide oral formulations for dog cardiovascular therapy.**

Cristian Marcelo Valiante Unanua, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2022

Gonzalo Suárez (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República), Manuel Ibarra
(Facultad de Química, Universidad de la República), Silvana Alvariza (Facultad de
Veterinaria, Universidad de la República).

Abstract

In this master's thesis work, an approach is made to the pharmacokinetic study of oral formulations of the drug furosemide used in cardiological therapy in veterinary medicine in our country for oral administration in dogs, from a pharmacometric approach as a quantitative and applied discipline that allows us to develop computational models to predict the kinetics of the drug in the species studied. It is proposed to develop an *in silico*

model that represents the processes of release, absorption, distribution and elimination of furosemide with action on the cardiovascular system in dogs, integrating the information linked to the formulations for veterinary use present in the Uruguayan market, the active principle in question and the species under study. The formulations are firstly evaluated by means of *in vitro* dissolution tests in a USP II dissolution apparatus using biorelevant dissolution media cited by the World Health Organization and adapted according to the normal physiological conditions of the canine gastrointestinal tract following the bioequivalence study guides for veterinary products of the Committee for Veterinary Medicines of the European Medicines Agency, within the framework of pharmacokinetic models based on the physiology of the species. Dissolution tests were complemented by disintegration tests of each of the oral formulations under study. The integration of this information in PBPK (*Physiological based pharmacokinetic modeling*) models was used to evaluate the relative performance between available formulations in terms of elicited drug exposure, simulating virtual interchangeability tests using PK-Sim® and MoBi® software. The application of the *in vitro-in silico-in vivo* approach is presented as an interesting alternative to address and reduce the variability of pharmaceutical products in biopharmaceutical quality, mainly in developing countries in which demonstrated bioequivalence is not required and even less in formulations used in veterinary medicine. The contrast of the *in silico* model was carried out with a pharmacokinetic sampling in healthy dogs to which the two presentations of furosemide available in the Uruguayan market in the form of tablets for oral administration were cross-administered. The quantification of the drug concentration in blood was carried out through an analytical method validated by the HPLC-FLD system. *In vivo* data of plasma concentrations were used to contrast the computational model and thus be able to evaluate significant differences between formulations of furosemide for veterinary use used and

commercialized in the market. The model was optimized including a concentration-dependent increase in renal blood flow, affecting furosemide renal excretion. Dissolution profiles from two local products obtained in biorelevant conditions were fitted with a Gompertz model and included in the PBPK model to predict the relative performance between studied formulations. Area under the curve of plasmatic concentrations as a function of time from zero to infinity (AUC_{0-inf.}) and maximum drug concentration (C_{max}) were predicted with a relative bias of less than 20% for both formulations. The predicted test/reference ratio in simulated dogs (n=1000) was 0.156 for AUC_{0-inf.} (90% CI 0.102-0.249) and 0.146 for C_{max} (90% CI 0.105-0.202), whereas the results observed in in vivo assay were 0.148 for AUC_{0-inf.} (90% CI 0.106-0.208) and 0.163 for C_{max} (90% CI 0.103-0.256). The PBBM (*Physiologically-Based Biopharmaceutics Modeling*) approach adequately predicted the pharmacokinetics of furosemide and the relative performance between the veterinary products in dogs. The formulations studied were not bioequivalent according to the bioequivalence test in healthy dogs and the PBPK simulation with a population approach. PBPK model developed in this research may be used in the future in the evaluation of other furosemide products on the pharmaceutical market that are intended to be used in dogs by both regulatory authorities and pharmaceutical laboratories, and also in the development of bioequivalent products with respect to the formulation of reference making the process more efficient. Likewise, the model could be extended to a PBPK/PD model, where a relationship between exposure to furosemide and the effect is included. This tool, which should be validated in new clinical trials, could be very useful to support the development of innovative formulations. In summary, PBBM approach adequately predicted the pharmacokinetics of furosemide and the relative performance of the product in dogs, proving to be an effective tool and alternative to the clinical trial that can make predictions with an adequate level of

confidence and markedly lower requirements of infrastructure and research resources in the clinical trials. areas of research, development and regulation of veterinary pharmaceutical products.

Índice de contenidos

Capítulo 1. Introducción

- i. Caracterización del problema y objetivos
- ii. Antecedentes
- iii. Generalidades de los modelos farmacocinéticos basados en fisiología (PBPK)
- iv. Fármaco de estudio
- v. Estrategia de trabajo

Capítulo 2. Ensayos *in vitro* de comprimidos de liberación inmediata conteniendo furosemide como único principio activo.

- i. Ensayos de disolución en aparato USP II en medios de disolución biorrelevantes
 - a. Ensayo de disolución en Aparato II USP - pH 1.2
 - b. Ensayo de disolución en Aparato II USP - pH 4.5
 - c. Ensayo de disolución en Aparato II USP - pH 6.8
 - d. Modelización empírica de los perfiles de disolución de las formulaciones de uso veterinario de furosemide para administración por vía oral
- ii. Ensayos de desintegración de comprimidos de liberación inmediata conteniendo furosemide como único principio activo.
- iii. Discusión y conclusiones

Capítulo 3. Modelado PBPK utilizando el software PK-Sim®

- i. Diseño del modelo farmacocinético por integración *in silico* de parámetros fisicoquímicos e información bibliográfica de furosemide en perros
- ii. Consideraciones del modelo PBPK desarrollado a partir de parámetros fisicoquímicos, biológicos e información bibliográfica de furosemide en perros
- iii. Integración de información *in vitro* biorrelevante y aplicación del modelo PBPK a las formulaciones en estudio

Capítulo 4. Ensayo de bioequivalencia en perros sanos y contrastación *in vivo-in silico* del modelo farmacocinético poblacional.

- i. Desarrollo y validación del método analítico para la extracción y cuantificación de furosemide en plasma canino por HPLC-FLD.
- ii. Diseño y resultados del ensayo de bioequivalencia en perros sanos
- iii. Evaluación de la capacidad predictiva del modelado biofarmacéutico basado en fisiología aplicado a la bioequivalencia virtual.

- iv. Discusión y análisis de resultados

Capítulo 5. Consideraciones finales

Referencias bibliográficas

Anexo I. Técnicas de laboratorio para la determinación de la estabilidad de furosemide en metanol y medios de disolución biorrelevantes

- Determinación de la estabilidad de las soluciones metanólicas de furosemide en heladera (4-8 °C)
- Control de la estabilidad de las soluciones calibradoras de furosemide en los medios biorrelevantes para los ensayos de disolución en aparato USP II

Anexo II. Técnica experimental y validación del método analítico para la extracción y cuantificación de furosemide en plasma canino.

Anexo III. Preparación de medios de disolución biorrelevantes para los ensayos de disolución de comprimidos de furosemide de liberación inmediata.

Anexo IV. Protocolo experimental del ensayo de bioequivalencia y perfiles farmacocinéticos individuales

Lista de tablas

Tabla 1. Porcentaje de disolución (% Dis) en función del tiempo para cada una de las marcas comerciales en medio pH 1.2. Los valores de porcentaje de disolución por debajo del límite de cuantificación se informan como cero (disolución muy reducida del principio activo).

Tabla 2. Parámetros de disolución en medio pH 1.2 con su respectivo coeficiente de variación informado entre paréntesis y cocientes test/referencia con el intervalo de confianza al 90% informado entre paréntesis (límite inferior - límite superior). Se expresan los resultados con un criterio de dos cifras significativas en posición decimal.

Tabla 3. Porcentaje de disolución (% Dis) en función del tiempo para cada una de las marcas comerciales en medio pH 4.5. Los valores de porcentaje de disolución por debajo del límite de cuantificación se informan como cero.

Tabla 4. Parámetros de disolución en medio pH 4.5 con su respectivo coeficiente de variación informado entre paréntesis y cocientes test/referencia con el intervalo de confianza al 90% informado entre paréntesis (límite inferior - límite superior). Se expresan los resultados con un criterio de dos cifras significativas en posición decimal.

Tabla 5. Porcentaje de disolución (% Dis) en función del tiempo para cada una de las marcas comerciales en medio pH 6.8. Los valores de porcentaje de disolución por debajo del límite de cuantificación se informan como cero.

Tabla 6. Parámetros de disolución en medio pH 6.8 con su respectivo coeficiente de variación informado entre paréntesis y cocientes test/referencia con el intervalo de confianza al 90% informado entre paréntesis (límite inferior - límite superior). Se expresan los resultados con un criterio de dos cifras significativas en posición decimal.

Tabla 7. Parámetros de la modelización de Gompertz (media y desviación estándar) para los perfiles de disolución de las formulaciones test y referencia de furosemide para administración oral en perros.

Tabla 8. Resultados de tiempos de desintegración total en minutos para los comprimidos numerados desde C1 a C6 (comprimido uno a comprimido seis) con mediana y rango (valor mínimo observado – valor máximo observado) por marca comercial.

Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos incorporados al modelo *in silico* con sus respectivos valores, unidades de medida y referencias bibliográficas correspondientes.

Tabla 10. Valores fisiológicos-farmacocinéticos iniciales para las proteínas metabolizadoras y transportadoras de furosemide utilizados en la exploración inicial del modelo para administración por vía intravenosa. El asterisco refiere a un valor calculado a partir de la constante de catálisis (kcat) en unidades 1/min del modelo farmacocinético para furosemide en plasma de Britz et al. (2020) y las concentraciones establecidas para cada uno de los transportadores. En el caso de no hallarse el valor correspondiente, se informa como un guión simple en la tabla (-).

Tabla 11. Valores fijados en el modelo para la enzima metabolizadora UGT1A9 (concentración de referencia y Vmax), fracción de la tasa de filtración glomerular y parámetros de secreción tubular activa con cinética Michaelis-Menten (TS Km y TSmax_spec) luego de realizados los análisis de sensibilidad y las optimizaciones de parámetros (parameter optimization) correspondientes.

Tabla 12. Variación en el flujo sanguíneo renal dependiente de la concentración máxima observada de furosemide en plasma (Cmax) determinada por optimización de parámetros multivariable y valor predicho para dicha variación del flujo sanguíneo renal por la ecuación Emax del modelo farmacodinámico.

Tabla 13. Parámetros estimados del modelo Emax para la variación del flujo sanguíneo renal dependiente de la concentración plasmática de furosemide con su correspondiente unidad de medida.

Tabla 14. Tiempo de latencia optimizado según la velocidad de administración de furosemide en mg/h de acuerdo a las diferentes administraciones analizadas, siendo perfusiones intravenosas (PIV) de 8 horas, 2 horas y 30 minutos, y una administración en bolo (IV bolo) con una duración reportada de 10 segundos.

Tabla 15. Valores fijados en el modelo luego de realizados los análisis de sensibilidad y las optimizaciones de parámetros (parameter optimization) correspondientes utilizando los datos bibliográficos correspondientes a la absorción dada la administración por vía oral de furosemide en perros Beagle sanos de 10 kg a 13 kg (Koh et al., 2021).

Tabla 16. Estimación de los parámetros de bioequivalencia poblacional a partir de los perfiles farmacocinéticos simulados tras una dosis única de furosemide por vía oral en ayunas de formulación test y formulación referencia.

Tabla 17. Resultados para Tmax de test y referencia expresados como mediana, valor máximo observado y valor mínimo observado en minutos.

Tabla 18. Cocientes test/referencia (T/R) para AUC0-inf. y Cmax expresados como media geométrica y su intervalo de confianza al 90% (IC 90%) en extremo inferior (Inf.) y superior (Sup.).

Tabla 19. Resultados medios y desviación estándar de los parámetros área bajo la curva entre los tiempos de inicio y finalización del ensayo (AUC0-T), constante de eliminación beta (β), área bajo la curva de cero a infinito (AUC0-inf.) y concentración máxima (Cmax).

Tabla 20. Resultados para Tmax de test y referencia expresados como mediana, valor máximo observado y valor mínimo observado en minutos.

Tabla 21. Resultados de los parámetros AUC0-T, AUC0-inf. y Cmax corregidos por la dosis administrada (D) y por el peso corporal (Pc) para productos test y referencia.

Tabla 22. Cocientes test/referencia (T/R) para AUC0-inf. y Cmax expresados como media geométrica y su intervalo de confianza al 90% (IC 90%) en extremo inferior (Inf.) y superior (Sup.).

Tabla 23. Resultados de la evaluación *in silico-in vivo* del modelo para las métricas AUC0-inf. y Cmax y sus respectivos cocientes T/R. Se informa el error relativo (ER) en forma porcentual (%).

Lista de figuras

Figura 1. Estructura molecular de furosemide (5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2- [(2-furanylmethyl) amino] benzoic acid. (National Center for Biotechnology Information, 2022).

Figura 2. Perfil de disolución para las tres formulaciones en medio a pH 1.2, graficado como porcentaje disuelto respecto al valor declarado en función del tiempo. Para lograr una mejor visualización, se grafica el eje de las ordenadas en el rango de 0% a 50% de principio activo disuelto respecto al valor declarado.

Figura 3. Perfil de disolución en medio pH 4.5 para las tres formulaciones graficado como porcentaje disuelto respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo en minutos. Se informa valor medio y desviación estándar.

Figura 4. Perfil de disolución en medio pH 6.8 para las tres formulaciones graficado como porcentaje disuelto respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo en minutos. Se informa media aritmética y desviación estándar para cada tiempo.

Figura 5. Perfiles de disolución simulados en medio pH 1.2 para las formulaciones veterinarias graficado como porcentaje disuelto (con su correspondiente SD) respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo.

Figura 6. Perfiles de disolución simulados en medio pH 4.5 para las formulaciones veterinarias graficado como porcentaje disuelto (con su correspondiente SD) respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo.

Figura 7. Perfiles de disolución simulados en medio pH 6.8 para las formulaciones veterinarias graficado como porcentaje disuelto (con su correspondiente SD) respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo.

Figura 8. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación veterinaria PV1 a pH 1.2 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico. La recta continua en color negro corresponde a la función identidad.

Figura 9. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación veterinaria PV1 a pH 4.5 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Figura 10. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación veterinaria PV1 a pH 6.8 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Figura 11. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV2 a pH 1.2 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Figura 12. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV2 a pH 4.5 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Figura 13. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV2 a pH 6.8 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Figura 14. Representación esquemática de la estructura relacional y espacial del modelo para cuerpo completo de la simulación en PK-Sim® con los órganos y tejidos considerados (Pelkonen et al., 2008).

Figura 15. Representación esquemática del flujo de trabajo de desarrollo de modelo PBPK para un medicamento administrado por vía oral incluyendo las etapas fundamentales del mismo (Ibarra et al., 2021).

Figura 16. Transportadores de influjo y eflujo involucrados en la absorción de furosemide a nivel intestinal identificador a partir de ensayos *in vitro* con péptidos sustitutos de BCRP, MRP4 y OATP2B1 en muestras digeridas de proteínas de membrana y proteínas vesiculares de células MDCK-II (Madin-Darby canine kidney type II). Extraída de Chapa et al. (2020) y traducida al español.

Figura 17. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (Lee et al., 1986) de acuerdo al mismo protocolo de administración para la población en estudio (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva desviación estándar en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

Figura 18. Simulación inicial de fracción excretada de furosemide para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4 kg a 17 kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (Lee et al., 1986) con su respectiva desviación estándar (marcadores y líneas finas en color negro).

Figura 19. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4 kg a 17 kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva desviación estándar en mg/L.

Figura 20. Simulación posterior a los ajustes presentados en la Tabla 11 para la fracción excretada de furosemide en perros Beagle (n=500) con pesos desde 7.4 kg a 17 kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (Lee et al., 1986) con su respectiva desviación estándar (marcadores y líneas finas en color negro).

Figura 21. Variación del flujo sanguíneo renal (FSR) en función de la concentración máxima de furosemide en plasma (en mg/L). La función de ajuste se representa con una línea de tendencia en color azul guionada. Los puntos observados se muestran con marcadores circulares negros con su correspondiente desviación estándar en líneas negras con remate superior e inferior.

Figura 22. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para el tiempo de latencia (marcadores en azul) con Tlag predicho por la función matemática ajustada en el eje de las abscisas y Tlag optimizado en el modelo a partir de los datos experimentales bibliográficos en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Figura 23. Fracción excretada de furosemide en orina simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color negro) con su respectiva desviación estándar (líneas finas verticales de color negro).

Figura 24. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 2 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo 90%CI frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva SD en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

Figura 25. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 30 minutos a velocidad constante (línea azul gruesa) con su 90%CI frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva SD en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

Figura 26. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 10kg a 13kg tras una administración de 2mg/kg de furosemide por vía oral (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% (líneas finas verticales de color azul con borde superior e inferior) frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva desviación estándar en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

Figura 27. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas de acuerdo al modelo optimizado (según Tabla 15) en absorción oral para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 10 kg a 13 kg tras una administración de 2mg/kg de furosemide con su respectivo 90% CI (color azul) frente a los datos de bibliografía con su SD (color rojo).

Figura 28. Perfiles farmacocinéticos medios correspondientes al ensayo de bioequivalencia para ambas marcas comerciales.

Figura 29. Perfiles farmacocinéticos simulados (concentración en ug/L en función del tiempo en horas) para población n=1000 luego de la administración de dos comprimidos por vía oral de la formulación veterinaria Referencia. El gráfico corresponde a la media aritmética de concentraciones plasmáticas venosas (línea gruesa en color rojo) con su respectivo 90%CI. La contrastación con los datos observados *in vivo* puede observarse con los datos expresados en su valor medio (puntos en color negro) y su respectiva desviación estándar (líneas finas en color negro con terminación en punta invertida).

Figura 30. Perfiles farmacocinéticos simulados (concentración en ug/L en función del tiempo en horas) para población n=100 luego de la administración de dos comprimidos por vía oral de la formulación veterinaria Test. El gráfico corresponde a la media aritmética de concentraciones plasmáticas venosas (línea gruesa en color azul) con su 90%CI. La contrastación con los datos observados *in vivo* puede observarse con los datos expresados en su valor medio (puntos en color negro) y su respectiva desviación estándar (líneas finas en color negro con terminación en punta invertida).

Lista de abreviaturas

% Dis – porcentaje de disolución respecto al valor declarado

ANOVA - análisis de varianza

AUC - área bajo la curva de concentraciones plasmáticas

BCRP - Breast cancer resistance protein

Cmax - concentración plasmática máxima

CV – coeficiente de variación

CVMP - Committee for Veterinary Medicinal Products

DE – eficiencia de disolución

E0 - efecto basal

EMA - European Medicines Agency

Emax - efecto máximo

EP – European Pharmacopeia

FLD – fluorescence detector (detector de fluorescencia)

FSR - flujo sanguíneo renal

GFR - glomerular filtration rate (tasa de filtración glomerular)

HPLC - high performance liquid chromatography

MDT – tiempo medio de disolución

MRP4 - Multidrug resistance protein 4

MSP - Ministerio de Salud Pública (Uruguay)

NF – National Formulary

OMS – Organización Mundial de la Salud

PBBM - Mechanistic Physiologically-Based Biopharmaceutics

PBPK - Physiological Based Pharmacokinetic modeling

RNA-Seq - Secuenciación del ARN

SD - desviación estándar

SE – error estándar

T/R – cociente test/referencia

UGT1A9 - UDP-glucuronosiltransferasa 1-9

USP – United States Pharmacopeia

WHO - World Health Organization

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de la eficiencia de disolución (DE). Donde y corresponde al porcentaje de disolución, t al tiempo en minutos e y_{100} el 100% del porcentaje de disolución asignado a tiempo t (tiempo tiempo final del ensayo de disolución).

Ecuación 2. Cálculo del tiempo medio de disolución (MDT). Donde t_i corresponde al tiempo en el punto medio entre los extremos i e $(i-1)$ y ΔMi la cantidad adicional de fármaco disuelto en el intervalo determinado entre i e $i-1$.

Ecuación 3. Determinación del factor de similitud (f_2). R_t y T_t representan el porcentaje disuelto del perfil de disolución del producto referencia y del producto test respectivamente a tiempo t , y n es el número de puntos de muestreo utilizados en la determinación del factor de similitud.

Ecuación 4. Cálculo del intervalo de confianza al 90% (90%CI). El cociente T/R corresponde al cociente de medias test/referencia para cada parámetro calculado, t corresponde a la distribución t de student y SE Ratio al error estándar para el cociente de medias aritméticas.

Ecuación 5. Ecuación del modelo de Gompertz. %Dis (t) representa el porcentaje disuelto de furosemide para cada uno de los tiempos de muestreo y el tiempo en minutos. El parámetro alfa (α) determina la cantidad disuelta a tiempo $t=1$ y el parámetro beta (β) denota la tasa de disolución por unidad de tiempo.

Ecuación 6. Determinación del peso molecular efectivo utilizada. MW_{eff} representa el peso molecular efectivo, MW el peso molecular, N el número de átomos de halógenos en la molécula y CF el factor de corrección según el halógeno, siendo $CF=17$ para flúor, $CF=22$ para cloro, $CF=62$ para bromo y $CF=98$ para iodo.

Ecuación 7. Ecuación matemática de ajuste del modelo E_{max} sigmoideo. E_0 corresponde al flujo sanguíneo renal estimado en condiciones basales, E es el efecto medido como aumento en el flujo sanguíneo renal, E_{max} el efecto máximo observado, C la concentración de furosemide en mg/L, C_{50} la concentración a la cual se observa el 50% del efecto máximo observado (E_{50}) y γ (\square) que define el perfil sigmoideo de la curva concentración-efecto.

Ecuación 8. Ecuación matemática de ajuste del modelo E_{max} no sigmoideo. E_0 corresponde al flujo sanguíneo renal estimado en condiciones basales, E es el efecto medido como aumento en

el flujo sanguíneo renal (FSR), E_{max} el efecto máximo observado, C la concentración de furosemide en mg/L y C_{50} la concentración a la cual se observa el 50% del efecto máximo observado (E_{50}).

Ecuación 9. Variación del tiempo de latencia (en minutos) observado en el inicio del efecto de aumento del flujo sanguíneo renal canino inducido por furosemide en función de la velocidad de administración de la perfusión intravenosa en mg/h.

Capítulo 1. Introducción

En este primer capítulo se pretende brindar al lector una introducción a la problemática abordada en esta tesis de maestría, así como a los antecedentes y las generalidades de la principal herramienta utilizada, los modelos farmacocinéticos basados en fisiología (PBPK, por sus siglas en inglés, *physiologically-based pharmacokinetics*) y el enfoque de modelado biofarmacéutico basado en fisiología (PBBM, por sus siglas en inglés *physiologically-based biopharmaceutics modeling*). De la misma forma se presenta en este capítulo el fármaco de trabajo y sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas de interés, enmarcado en la situación de los medicamentos conteniendo dicho fármaco en el mercado farmacéutico veterinario uruguayo que ha incentivado la selección del mismo para la presente investigación así como los objetivos generales y específicos de la misma.

i. Caracterización del problema y objetivos

En Uruguay existe y está aprobado desde el 12 de enero de 2007 el Decreto del Poder Ejecutivo N° 12/007 (correspondiente al Ministerio de Salud Pública de Uruguay) que detalla las recomendaciones técnicas para la realización de estudios de bioequivalencia y la intercambiabilidad de medicamentos para uso en seres humanos entre equivalentes farmacéuticos. Dos medicamentos se consideran equivalentes farmacéuticos cuando contienen el mismo principio activo, en la misma concentración, forma farmacéutica, vía de administración, posología e indicación terapéutica. Los estudios de bioequivalencia son ensayos clínicos donde se evalúa la capacidad de un medicamento para conseguir un perfil de ingreso del principio activo a la circulación sistémica similar respecto al equivalente farmacéutico original, o de referencia. Se realizan para responder a la necesidad de evaluar la calidad farmacéutica de los medicamentos en protección de la salud de los individuos y de avalar en el mercado uruguayo medicamentos seguros y eficaces (Decreto N° 12/007, 2007). Un medicamento es considerado bioequivalente (o genérico) y presenta mayor probabilidad de ser intercambiable en la terapia farmacológica cuando el cociente test/referencia de medias poblacionales para los parámetros Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (AUC) y concentración plasmática máxima (C_{max}) queda comprendido entre 0.80 y 1.25 con un intervalo de confianza de 90% (WHO, 2006). De esta manera se evalúa que la biodisponibilidad

lograda por un equivalente farmacéutico, es decir la cantidad y la velocidad con la cual un principio activo ingresa a la circulación sistémica tras una administración extravascular, sea similar (+/- 20%) respecto a la conseguida por el medicamento original, el cual posee otros estudios clínicos que respaldan su calidad farmacéutica. En el caso de no poseer bioequivalencia farmacéutica demostrada respecto al medicamento de referencia, un medicamento es considerado similar, y su capacidad para lograr una exposición adecuada del organismo al principio activo permanecerá desconocida.

En medicina veterinaria no existe actualmente una regulación o reglamentación que asegure la calidad biofarmacéutica de los productos que se comercializan en el mercado farmacéutico uruguayo. Cabe destacar que en el ámbito clínico es sabido por los profesionales de la salud veterinaria que diferentes medicamentos conteniendo un mismo principio activo pueden tener un impacto marcadamente distinto en cuanto a la efectividad de los tratamientos y/o la presentación de reacciones adversas y sin embargo se utilizan en muchos casos como formulaciones intercambiables según la disponibilidad en el mercado y el costo. Por otro lado, dada la existencia de múltiples medicamentos similares comercializados en plaza y en uso terapéutico vigente, se visualiza como imposible la realización de ensayos de bioequivalencia para cada uno por razones económicas, éticas, de infraestructura y de capacidad de investigación en el país. Surge de esta forma la necesidad en nuestro país de impulsar el estudio farmacocinético de formulaciones de uso veterinario disponibles en plaza y desarrollar un método alternativo que subrogue dichos ensayos clínicos con un adecuado nivel de confianza aportando así un marcado aumento en la posibilidad de investigación dada la reducción en la infraestructura necesaria y demostrando que el modelado biofarmacéutico basado en fisiología (PBBM) puede utilizarse para resolver esta problemática y brindar una herramienta de marcado impacto tanto para laboratorios de la industria farmacéutica como para consumidores de los medicamentos comercializados, así como también a los organismos estatales encargados de la regulación farmacéutica de dichos productos.

Relatos clínicos de diferencias terapéuticas observadas dependientes del producto farmacéutico utilizado en pacientes del Hospital Veterinario de Facultad de Veterinaria (Universidad de la República) motivaron la presente investigación, particularmente desde la Unidad de Farmacología y Terapéutica y desde la Policlínica de Cardiología (Ruta 8 Km. 18 y Ruta 102, CP 91600, Montevideo, Uruguay).

El objetivo general de esta tesis es estudiar mediante un enfoque farmacocinético *in vitro-in silico* basado en fisiología las formulaciones orales del fármaco furosemide de uso veterinario y comercializadas en el país para la terapia cardiológica en perros. La selección del fármaco en estudio se estableció dada la problemática clínica vigente de la existencia de dos marcas comerciales sin intercambiabilidad demostrada con posibles diferencias en la eficacia de los tratamientos cardiológicos y la evolución de los pacientes. Como objetivos específicos de la investigación se pretende en primer lugar desarrollar un modelo farmacocinético a partir de datos de disolución *in vitro* para las formulaciones disponibles en medios biorrelevantes ajustados a la fisiología del tracto gastrointestinal del perro en condiciones normales acoplado a un sólido conocimiento previo respecto a la farmacocinética y farmacodinamia del fármaco en la especie de estudio. En segundo lugar se pretende evaluar el impacto en diferencias de concentraciones plasmáticas que puede tener el proceso de intercambio entre estos diferentes productos farmacéuticos de distinta marca comercial conteniendo furosemide como único principio activo.

ii. Antecedentes

Los modelos farmacocinéticos basados en fisiología (PBPK) han ido desarrollándose en las últimas décadas como una herramienta adecuada para el modelado farmacocinético de fármacos combinando datos experimentales y/o bibliográficos con información sobre la fisiología y la biología a nivel de organismo para lograr una representación mecanicista de la farmacocinética (Kuepfer et al., 2016) y la predicción de bioequivalencia entre formulaciones en forma virtual (a través de modelos *in silico*) aproximándose a los ensayos de bioequivalencia *in vivo* (Doki et al., 2017). Estos modelos matemáticos mecanicistas integran el conocimiento previo de parámetros anatómicos, bioquímicos y fisiológicos de animales o humanos, propiedades fisicoquímicas de sustancias farmacológicas y formulación propiedades de los medicamentos para predecir la farmacocinética *in vivo* y sus perfiles de concentraciones plasmáticas (Zhang et al., 2011).

Diferentes trabajos en modelado *in silico* y bioequivalencia virtual han sido publicados con diversos fármacos y formulaciones farmacéuticas correspondientes (Cristofolletti et al., 2017; Doki et al., 2017; Ibarra et al, 2018), sin embargo se verifica una gran ausencia de información científica en cuanto al desarrollo de modelos farmacocinéticos

computacionales y predictivos de furosemide utilizando formulaciones de administración oral, muy comúnmente utilizadas en terapias cardiológicas en caninos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Bikdeli et al, 2013; Koh et al., 2021).

En el equipo de trabajo se han estudiado previamente los modelos PBPK y sus características principales a la hora de predecir concentraciones de fármacos a nivel plasmático y en tejidos (Ibarra et al., 2020). Por otro lado se han desarrollado anteriormente proyectos de investigación de especialidades farmacéuticas de uso humano utilizando procedimientos de integración *in vitro-in silico* con modelado PBPK para predecir diferencias y similitudes en biodisponibilidad y bioequivalencia de formulaciones comercializadas en plaza de antihipertensivos como por ejemplo Carvedilol (Ibarra et al., 2018), fármaco utilizado además en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y la cardiopatía isquémica en combinación con otros fármacos en cardiología humana (Castro et al., 2004; Florio et al., 2018) y canina (Talavera et al., 2005; Soares et al., 2010).

iii. Generalidades de los modelos farmacocinéticos basados en fisiología (PBPK)

Los modelos PBPK son modelos enmarcados dentro del enfoque conocido como “bottom up” (Lu et al., 2017) dado que ofrecen un escenario para la integración de información relevante a nivel biológico y químico, permitiendo luego la predicción del comportamiento farmacocinético de un sistema organismo-medicamento mediante simulaciones (en su mayoría trabajadas en forma computacional a través de software específico que relacionan la programación, la fisiología, la farmacocinética y en algunos casos además la farmacodinamia). Las simulaciones acerca del comportamiento de un sistema biológico son desarrolladas por las plataformas informáticas PBPK generalmente como concentraciones de fármaco a lo largo del tiempo tras la administración de determinado plan posológico, en distintos tejidos y fluidos, incluyendo la sangre y órganos relacionados con el mecanismo de acción farmacológico, el metabolismo o la excreción del fármaco y/o sus metabolitos. El ajuste de los parámetros biológicos y químicos en el modelado PBPK es una parte esencial del refinamiento de un modelo predictivo, guiado por diferentes softwares ya existentes para el desarrollo de modelos PBPK en distintas especies entre los cuales se destacan GastroPlus™ , PK-Sim® y SimCyp® (Al-Tabakha et al., 2020).

En bioequivalencia, la utilización de estos modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos desarrollados en forma computacional para realizar predicciones de los ensayos clínicos *in vivo* ha sido bautizada como “bioequivalencia virtual” (Loisios-Konstantinidis et al., 2019). Además de predecir, los modelos PBPK permiten la incorporación de datos *in vivo* e *in vitro* para realizar una contrastación del modelo y evaluar el ajuste del mismo a los datos obtenidos experimentalmente en animales y/o humanos, es decir que puede refinarse el modelo desarrollado con información observada experimentalmente *a posteriori*.

iv. Fármaco de estudio

Furosemide (o furosemida) es un fármaco de carácter ácido de acuerdo a su estructura química derivada del ácido antranílico con una elevada potencia como diurético (Boer D. et al., 2005) y ejerce su acción farmacológica en el sector luminal de la rama ascendente del asa de Henle a nivel renal (Brunton L. et al., 2006). Pertenece al grupo farmacológico de los diuréticos de asa o de techo alto y su mecanismo de acción consiste en inhibir el simporte de sodio-cloruro-potasio a nivel de la rama ascendente del asa de Henle y por lo tanto aumenta la excreción renal de sodio, potasio y agua (Papich, 2021). Es utilizado en pacientes cardiopatas caninos en la terapéutica de la insuficiencia cardíaca crónica principalmente de tipo congestiva. La primera causa de la insuficiencia cardíaca crónica (en aproximadamente el 75% de los perros adultos que llegan a la clínica por consulta cardiológica) es la enfermedad valvular auriculoventricular degenerativa crónica o enfermedad de la válvula mitral degenerativa crónica (Benavides et al., 2014) y la misma es el resultado fisiopatológico de la degeneración mixomatosa (Borgarelli et al., 2012) y como segunda causa a la cardiomiopatía dilatada (Soares et al., 2010).

Furosemide es un fármaco con baja solubilidad en solución acuosa a pH ácido y baja permeabilidad, por lo cual se clasifica como clase IV en el sistema de clasificación biofarmacéutica (Amidon et al., 1995) y se absorbe en forma incompleta a lo largo del tracto gastrointestinal (Fonseca y Garzón López, 2017). El fármaco posee un pKa de 3.9 (Moffat, 2011), siendo reportado en la literatura como un fármaco con biodisponibilidad errática por vía oral debido a su escasa disolución a pH estomacal y a la presencia de una ventana de absorción a nivel intestinal (Koh et al., 2021; Yakatan et al., 1979) en la

primera porción del duodeno. El fármaco se absorbe por difusión pasiva hacia los enterocitos y conforme al aumento gradual de pH (hacia un pH más básico a lo largo del tracto gastrointestinal) aumenta el porcentaje de fármaco que se encuentra ionizado con carga eléctrica negativa y disminuye la capacidad de atravesar las membranas celulares de los enterocitos y por ende de ser absorbido. Autores como Chapa et al. (2004) sugieren que furosemide es sustrato de transportadores de eflujo que limitan adicionalmente su permeabilidad a través de la pared intestinal, principalmente BCRP (por sus siglas en inglés *breast cancer resistance protein*) y MRP4 (por sus siglas en inglés *multidrug resistance protein 4*). Estos transportadores aumentan su expresión hacia segmentos distales del intestino (Lin y Yamazaki, 2003), , contribuyendo al fenómeno de “ventana de absorción”. Por lo tanto es de consideración que para un comprimido de liberación inmediata conteniendo furosemide como principio activo administrado por vía oral, la disolución se dará mayoritariamente en las primeras porciones del intestino delgado de acuerdo al pH del medio, tal y como se ha demostrado que la permeabilidad de furosemide y por lo tanto su absorción una vez disuelto disminuye significativamente a medida que la región intestinal se vuelve progresivamente distal (Markovik et al., 2020). A nivel estomacal la disolución es reducida debido al pH ácido de los jugos gástricos, sin embargo en el estómago se da la disgregación del comprimido y el pasaje hacia el duodeno posteriormente según la velocidad de vaciado gástrico del animal. Se reporta además que la tasa de vaciamiento gástrico está inversamente relacionada con el peso corporal en razas de perros de diferentes tamaños (Bourreau, 2004).

Con respecto a la disposición, furosemide circula a nivel del plasma sanguíneo principalmente unido a la albúmina sérica. Se reporta un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas cercano al 90% en perros (Cohen et al., 1976; Verbeek et al., 1981). El metabolismo de furosemide se produce en hígado y riñones por la enzima UGT1A9, siendo los riñones responsables de la mayor parte del clearance total del fármaco, aproximadamente el 55-60% se excreta en forma incambiada en orina (Hirai et al., 1992; The Merck veterinary manual, 2015) y el resto implica biotransformación por glucuronidación (Oh & Han, 2015; Plumb, 2018). Además furosemide puede afectar su propia excreción renal en función de la dosis administrada en la terapia debido a que causa venodilatación renal, aumenta la tasa de filtración glomerular y aumenta el flujo sanguíneo destinado a los riñones (Hori et al., 2006; Koh et al., 2021).

El fármaco de trabajo se encuentra en el mercado uruguayo en varias especialidades farmacéuticas de uso humano registradas en el MSP (Ministerio de Salud Pública) y dos especialidades farmacéuticas de uso veterinario registradas en el MGAP en forma de comprimidos de liberación inmediata que serán referenciados en el trabajo como productos veterinarios 1 y 2 (PV1 y PV2). En el presente trabajo de tesis se estudiaron ambas formulaciones disponibles en plaza así como una tercera formulación de uso no veterinario (Furosemide EFA®) que es utilizada como referencia para los ensayos de disolución y desintegración, permitiendo así la comparación cuantitativa por diversos parámetros de uso común entre las formulaciones.

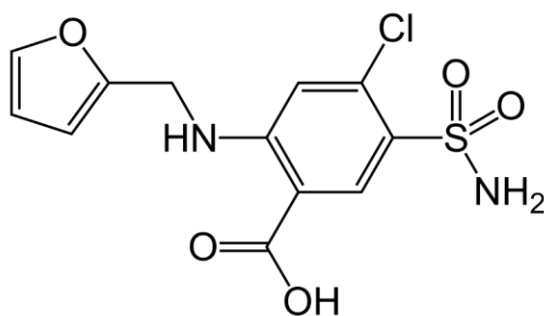


Figura 1. Estructura molecular de furosemide (5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2- [(2-furanylmethyl) amino] benzoic acid. (National Center for Biotechnology Information, 2022).

v. Estrategia de trabajo

A lo largo de los próximos capítulos se presentará el desarrollo de la investigación en función de la estrategia de trabajo pautada y programada, comenzando por la caracterización *in vitro* en medios biorrelevantes de los medicamentos de interés conteniendo furosemide como único principio activo, continuando con la integración de la información recabada experimentalmente en modelos PBPK siguiendo un enfoque PBBM para realizar predicciones *in silico* y finalmente evaluar las predicciones del modelo farmacocinético con los resultados de un ensayo de bioequivalencia realizado en perros sanos.

Capítulo 2. Ensayos *in vitro* de comprimidos de liberación inmediata conteniendo furosemide como único principio activo.

El objetivo específico que se aborda en este segundo capítulo es el desarrollo y la realización de los ensayos de disolución *in vitro* en condiciones biorrelevantes para comprimidos de liberación inmediata de administración oral conteniendo el fármaco de estudio como único principio activo y que se encuentran disponibles actualmente en el mercado uruguayo, realizando un enfoque veterinario de acuerdo a los objetivos generales y específicos de la investigación. Se presentan los ensayos de determinación de estabilidad para las soluciones de furosemide en el solvente orgánico de preparación de soluciones madre (metanol) así como también en los medios buffer acuosos a diferentes pH con los cuales se trabajó en los ensayos *in vitro*, con el objetivo de presentar los resultados que permitieron realizar la cuantificación de furosemide en los ensayos *in vitro* por espectrofotometría UV teniendo en cuenta la posibilidad de existencia de productos de degradación. Los ensayos *in vitro* realizados que se extienden en el presente capítulo corresponden a ensayos de desintegración de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 39-NF 34 capítulo <701> - Métodos físico químicos) y ensayos de disolución en medios biorrelevantes a tres pH de trabajo (1.2, 4.5 y 6.8) simulando el tránsito del fármaco a través del tracto gastrointestinal en base a las condiciones fisiológicas del mismo en caninos (Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition, 2006) y siguiendo las guías de estudios de bioequivalencia para productos veterinarios del Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento (EMA/CVMP, 2021). Se presenta el análisis estadístico en función del tratamiento de datos de los perfiles de disolución, que corresponde al cálculo de parámetros de disolución relevantes, comparaciones cuantitativas entre las diferentes formulaciones ensayadas y el ajuste de los perfiles de disolución a una función matemática general con parámetros individuales por formulación y por pH que permitan posteriormente el ingreso de dichos perfiles al software de modelado farmacocinético basado en fisiología (PBPK - physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation) para el diseño del modelo computacional para el fármaco de trabajo en la población canina de interés.

i. Ensayos de disolución en aparato USP II en medios de disolución biorrelevantes

Se realizaron ensayos de disolución en aparato USP II simulando el tránsito del fármaco a través del tracto gastrointestinal en base a las condiciones fisiológicas del mismo en caninos (Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition, 2006) y siguiendo las guías de estudios de bioequivalencia para productos veterinarios del Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento (EMA/CVMP, 2021) en su aplicación específica a ensayos *in vitro*. Según esta guía, los medios de disolución biorrelevantes son muy similares y en la mayoría de los casos coincidentes con los de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2006) debido a la similitud en la fisiología gastrointestinal entre humanos y la especie canina, se habilita y recomienda el uso de las soluciones reguladoras (buffers) de la farmacopea europea (EP., 2017). Estos ensayos *in vitro* buscan reproducir los diferentes procesos por los cuales transcurre el medicamento administrado por vía oral y posteriormente el principio activo en estudio a través de los distintos órganos del aparato gastrointestinal. Las soluciones buffer utilizadas en los ensayos de disolución fueron entonces preparadas de acuerdo al capítulo de soluciones buffer de la farmacopea europea (EP, 2017) en función de las recomendaciones del Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento (EMA/CVMP, 2021).

El equipo utilizado para los ensayos fue el aparato de disolución II de USP, Distek® 2100 C, configurado con 6 vasos acoplada a una bomba peristáltica Agilent 89092EO para toma de muestras manual o automatizada, utilizando muestreadores con filtros en línea, espectrofotómetro Agilent 8453 para cuantificación en línea de concentraciones de analito en cada vaso de disolución, CPU con software ChemStation® (Agilent). La temperatura de ensayo fue de 37.0 ± 0.5 °C durante todo el tiempo considerado, el volumen de medio empleado de 900 mL por vaso de disolución y la velocidad de agitación se configuró a 50 rpm de acuerdo a condiciones farmacopeicas. El muestreo automático se estableció a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 minutos.

La cuantificación del porcentaje disuelto de furosemide en función del tiempo en los ensayos de disolución en aparato USP II se realizó por espectrofotometría UV a 277nm de acuerdo a la monografía correspondiente a comprimidos de furosemide (USP 39-NF

34). Se preparó una curva de calibración por medio de disolución a cada uno de los tres pH de trabajo (1.2, 4.5 y 6.8) con seis soluciones calibradoras (E1 a E6) de acuerdo a lo expuesto en el Anexo I sección b en función de la cantidad declarada de furosemide en mg en los comprimidos de las formulaciones farmacéuticas a estudiar. Los ensayos de disolución se realizaron en forma consecutiva por pH, comenzando con los ensayos a pH 1.2, siguiendo con pH 4.5 y finalizando con pH 6.8.

Se evaluaron en el estudio tres medicamentos conteniendo furosemide como único principio activo: producto veterinario 1 (PV1), producto veterinario 2 (PV2) y Furosemide del laboratorio EFA®. La identidad de los productos veterinarios no es revelada y se reserva en el presente trabajo. Son comprimidos de liberación convencional en todos los casos para administración oral. Furosemide EFA® es una formulación de uso en medicina humana que es utilizada como referencia para los ensayos *in vitro* debido a la ausencia en nuestro mercado del producto original Lasix® (laboratorio Sanofi Aventi®) y debido además a presentar un perfil de disolución similar a este producto evaluado previamente en el área (Magallanes et al., 2016). De cada producto se utilizaron seis comprimidos (unidades) en seis vasos de disolución en el sistema de disolución USP II anteriormente descrito. Las formulaciones de uso veterinario son presentadas en los resultados sin indicación de la marca comercial y se abrevian como PV1 y PV2 (correspondiente a producto veterinario 1 y 2).

a. Ensayo de disolución en Aparato II USP - pH 1.2

Se utilizó una solución de ácido clorhídrico y cloruro de potasio (HCl/KCl) de pH 1.2 preparada inmediatamente antes de la realización del ensayo de disolución correspondiente de acuerdo al procedimiento descrito en el Anexo III. Se presenta a continuación la tabla con los resultados de la disolución como porcentaje respecto al valor declarado en la formulación en función del tiempo (min), con su correspondiente desviación estándar (SD) informado entre paréntesis en unidades de porcentaje:

Tiempo (min)	% Dis PV1	%Dis PV2	% Dis EFA®
5	0.00 (0.00)	11.59 (1.11)	14.59 (2.29)
10	0.00 (0.00)	22.42 (1.61)	26.19 (2.31)
15	0.00 (0.00)	28.96 (1.49)	32.73 (1.76)
20	0.00 (0.00)	33.05 (1.40)	36.65 (1.28)
30	0.00 (0.00)	37.61 (1.35)	40.23 (0.89)
40	0.00 (0.00)	39.61 (1.26)	42.13 (0.85)
60	3.60 (0.25)	41.71 (1.23)	43.97 (0.86)
90	4.36 (0.18)	43.52 (0.20)	44.99 (0.88)
120	5.24 (0.26)	43.76 (1.21)	45.55 (0.91)

Tabla 1. Porcentaje de disolución (% Dis) en función del tiempo para cada una de las marcas comerciales en medio pH 1.2. Los valores de porcentaje de disolución por debajo del límite de cuantificación se informan como cero (disolución muy reducida del principio activo).

En el siguiente gráfico se muestran los perfiles de disolución de medicamentos conteniendo furosemide como principio activo obtenidos en Aparato II USP en medio HCl/KCl pH 1.2 para tres formulaciones estudiadas:

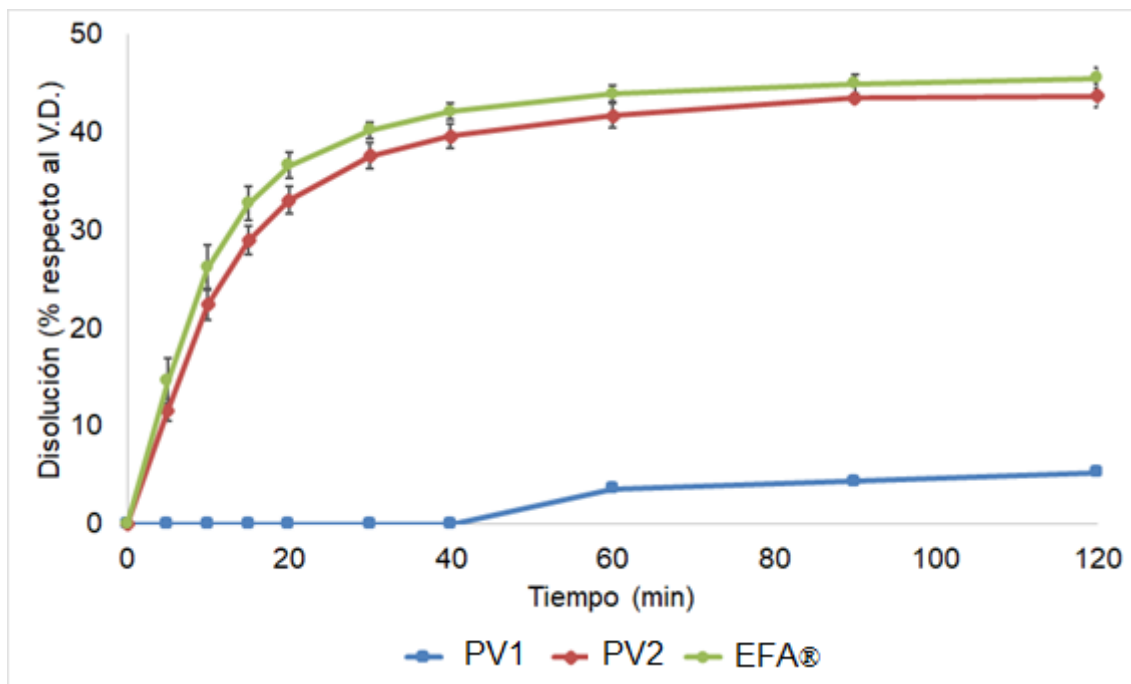


Figura 2. Perfil de disolución para las tres formulaciones en medio a pH 1.2, graficado como porcentaje disuelto respecto al valor declarado en función del tiempo. Para lograr una mejor visualización, se grafica el eje de las ordenadas en el rango de 0% a 50% de principio activo disuelto respecto al valor declarado.

En función de los perfiles de disolución de cada una de las marcas comerciales, se calculan las siguientes métricas para caracterizar la cinética de disolución: Eficiencia de disolución (DE) en porcentaje (%) y Tiempo medio de disolución (MDT) en minutos (min). Ambos parámetros fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones matemáticas por aplicación de la herramienta de cálculo DDSolver (Zhang et al., 2010):

$$DE = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \cdot 100\%$$

Ecuación 1. Cálculo de la eficiencia de disolución (DE). Donde y corresponde al porcentaje de disolución, t al tiempo en minutos e y_{100} el 100% del porcentaje de disolución asignado a tiempo t (tiempo tiempo final del ensayo de disolución).

$$MDT = \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot \Delta M_i}{\sum_{i=1}^n \Delta M_i}$$

Ecuación 2. Cálculo del tiempo medio de disolución (MDT). Donde t_i corresponde al tiempo en el punto medio entre los extremos i e $(i-1)$ y ΔM_i la cantidad adicional de fármaco disuelto en el intervalo determinado entre i e $i-1$.

Por otro lado, se calcula el factor de similitud (f_2) utilizando la marca EFA® como referencia. El factor de similitud (f_2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre las dos curvas de disolución. El factor de similitud f_2 es adimensional y un valor mayor a 50 indica diferencias entre los perfiles medios menores a 10%. La ecuación matemática para el cálculo del f_2 utilizada se presenta a continuación y es aplicada a través de la herramienta DDSolver (Zhang et al., 2010):

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Ecuación 3. Determinación del factor de similitud (f_2). R_t y T_t representan el porcentaje disuelto del perfil de disolución del producto referencia y del producto test respectivamente a tiempo t , y n es el número de puntos de muestreo utilizados en la determinación del factor de similitud.

Se utilizaron los cinco primeros puntos de cada ensayo, que si bien no cumplen estrictamente con la regulación vigente, brindan una importante idea de similitud entre los perfiles de disolución. Para DE y MDT no hay una especificación dado que no se usan en la regulación de bioequivalencia y bioexención, más bien son métricas que pueden ser utilizadas para correlacionar el rendimiento *in vitro* con el rendimiento *in vivo*. En ambos casos lo que se hace es estimar un cociente de medias Test/Referencia (T/R) con su respectivo intervalo de confianza al 90% (90%CI) calculado en forma paramétrica de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$90\% \text{ CI} = \frac{T}{R} \pm t_{(0.1, nR+nT-2)} \cdot SE$$

Ecuación 4. Cálculo del intervalo de confianza al 90% (90%CI). El cociente T/R corresponde al cociente de medias test/referencia para cada parámetro calculado, t corresponde a la distribución t de student y SE al error estándar para el cociente de medias aritméticas.

A continuación se presentan en la siguiente tabla los valores correspondientes a los parámetros de disolución calculados a pH 1.2 y los cocientes de medias T/R:

Parámetro	PV1	PV2	EFA®
DE (%)	1.74 (8.81%)	37.82 (2.02%)	40.07 (2.38%)
MDT(min)	55.08 (6.82%)	16.30 (6.64%)	14.43 (7.01%)
f2	25.14	72.62	-
T/R DE	0.043 (0.041 - 0.045)	0.94 (0.92 – 0.96)	-
T/R MDT	3.82 (3.60- 4.01)	1.13 (1.05 – 1.21)	-

Tabla 2. Parámetros de disolución en medio pH 1.2 con su respectivo coeficiente de variación informado entre paréntesis y cocientes test/referencia con el intervalo de confianza al 90% informado entre paréntesis (límite inferior - límite superior). Se expresan los resultados con un criterio de dos cifras significativas en posición decimal.

b. Ensayo de disolución en Aparato II USP - pH 4.5

Se realiza un procedimiento análogo para las mismas tres marcas comerciales de furosemide en las mismas condiciones de muestreo y equipamiento, utilizando en esta ocasión como medio un buffer fosfato de pH 4.5 preparada inmediatamente antes de la realización del ensayo de disolución correspondiente de acuerdo al procedimiento descrito en el Anexo III. Se presenta a continuación la tabla con los resultados de la disolución:

Tiempo (min)	% Dis PV1	%Dis PV2	% Dis EFA®
5	0.00 (0.00)	38.96 (6.14)	35.76 (5.74)
10	8.97 (0.87)	66.55 (4.42)	69.69 (7.93)
15	13.07 (0.87)	75.88 (2.62)	83.26 (7.91)
20	15.29 (0.82)	79.84 (2.35)	89.75 (7.54)
30	17.82 (1.04)	83.91 (2.23)	95.60 (6.62)
40	19.41 (1.02)	85.90 (2.18)	98.05 (5.36)
60	21.79 (1.01)	87.96 (2.29)	99.91 (3.74)
90	24.20 (0.99)	89.49 (2.34)	101.16 (2.36)
120	25.86 (1.27)	90.41 (2.32)	101.75 (1.73)

Tabla 3. Porcentaje de disolución (% Dis) en función del tiempo para cada una de las marcas comerciales en medio pH 4.5. Los valores de porcentaje de disolución por debajo del límite de cuantificación se informan como cero.

Se muestra a continuación el gráfico que representa los perfiles de disolución de medicamentos conteniendo furosemide como principio activo obtenidos en Aparato II USP en medio Buffer fosfato pH 4.5 para tres formulaciones comercializadas en el territorio uruguayo (dos formulaciones de uso veterinario y una formulación destinada a uso humano):

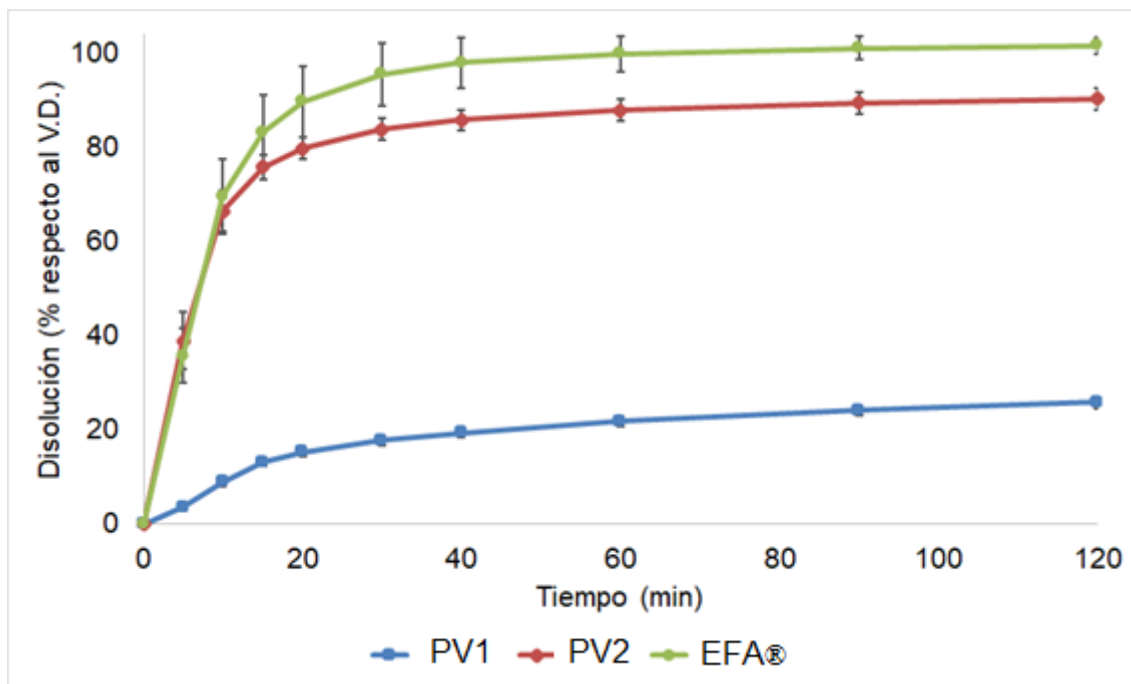


Figura 3. Perfil de disolución en medio pH 4.5 para las tres formulaciones graficado como porcentaje disuelto respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo en minutos. Se informa valor medio y desviación estándar.

En función de los perfiles de disolución de cada una de las marcas comerciales, se calculan los parámetros de disolución a pH 4.5: DE en porcentaje (%) y MDT en minutos (min). Así mismo se informa el valor del factor de similitud (f_2) tomando como referencia el perfil de disolución de EFA®. A continuación se presentan dichos parámetros de disolución y los cocientes de medias T/R:

Parámetro	PV1	PV2	EFA®
DE (%)	19.60 (4.54%)	82.28 (2.58%)	92.52 (4.16%)
MDT(min)	28.15 (8.09%)	10.80 (12.50%)	10.87 (2.98%)
f_2	9.17	55.03	-
T/R DE	0.21 (0.20 – 0.22)	0.89 (0.85 – 0.92)	-

T/R MDT	2.59 (1.94 – 3.22)	0.99 (0.73 – 1.24)	-
----------------	-----------------------	-----------------------	---

Tabla 4. Parámetros de disolución en medio pH 4.5 con su respectivo coeficiente de variación informado entre paréntesis y cocientes test/referencia con el intervalo de confianza al 90% informado entre paréntesis (límite inferior - límite superior). Se expresan los resultados con un criterio de dos cifras significativas en posición decimal.

c. Ensayo de disolución en Aparato II USP - pH 6.8

Se realiza un procedimiento análogo para las mismas tres marcas comerciales de Furosemide en las mismas condiciones de muestreo y equipamiento, utilizando en esta ocasión como medio un buffer fosfato de pH 6.8 preparada inmediatamente antes de la realización del ensayo de disolución correspondiente de acuerdo al protocolo detallado en el Anexo III. Se presenta a continuación la tabla con los resultados de la disolución a pH 6.8:

Tiempo (min)	% Dis PV1	% Dis PV2	% Dis EFA®
5	14.80 (1.41)	68.34 (6.63)	65.42 (9.23)
10	33.30 (2.21)	92.54 (1.42)	98.54 (1.67)
15	48.59 (2.52)	94.88 (0.52)	100.93 (2.20)
20	57.51 (2.96)	95.64 (0.52)	101.38 (2.29)
30	70.00 (3.59)	96.33 (0.60)	101.78 (2.21)
40	78.91 (4.30)	96.66 (0.61)	101.94 (2.22)
60	88.51 (4.67)	97.29 (0.66)	102.23 (2.26)
90	93.72 (5.05)	97.29 (0.66)	102.23 (2.26)

120

95.83 (5.12)

97.29 (0.66)

102.23 (2.26)

Tabla 5. Porcentaje de disolución (% Dis) en función del tiempo para cada una de las marcas comerciales en medio pH 6.8. Los valores de porcentaje de disolución por debajo del límite de cuantificación se informan como cero.

Se muestra en la siguiente figura el gráfico correspondiente a los perfiles de disolución de medicamentos conteniendo furosemide como principio activo obtenidos en Aparato II USP en medio Buffer fosfato pH 6.8 para tres formulaciones:

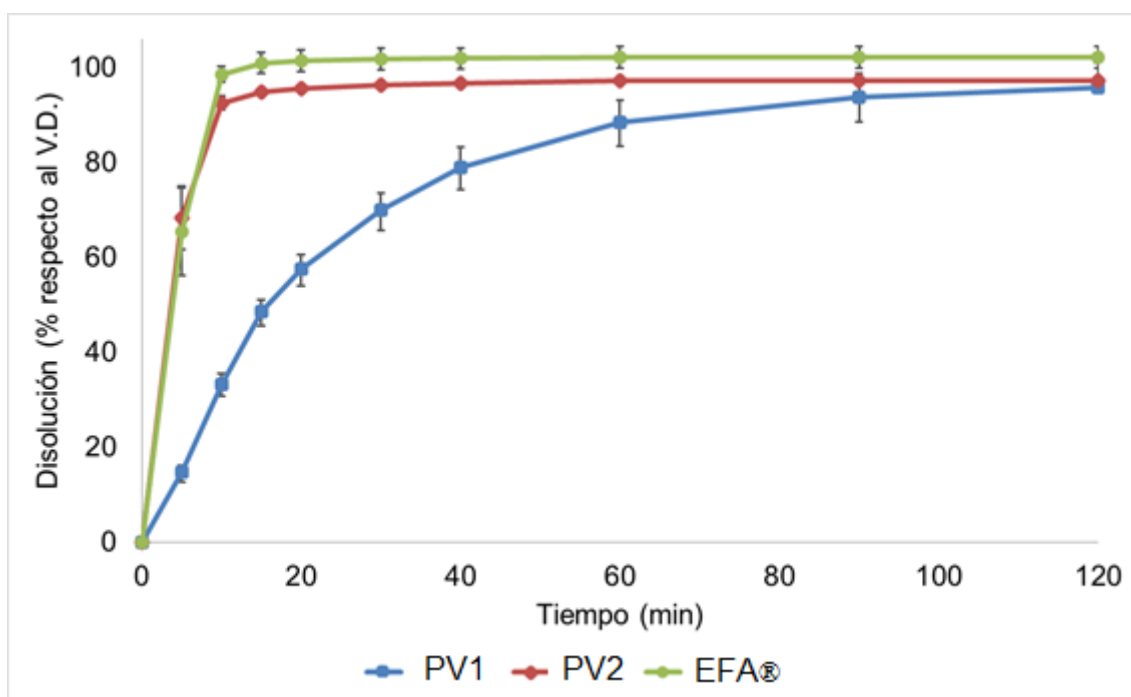


Figura 4. Perfil de disolución en medio pH 6.8 para las tres formulaciones graficado como porcentaje disuelto respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo en minutos. Se informa media aritmética y desviación estándar para cada tiempo.

Se calculan e informan a continuación los parámetros de disolución a pH 6.8 DE y MDT, el valor del factor de similitud (f_2) tomando como referencia el perfil de disolución de Furosemide EFA® y los cocientes test/referencia para DE y MDT:

Parámetro	PV1	PV2	EFA®
DE (%)	75.88 (5.18%)	93.50 (0.70%)	98.23 (1.94%)
MDT (min)	23.31 (5.29%)	4.68 (9.45%)	4.68 (10.71%)
f2	15.05	63.15	-
T/R DE	0.77 (0.74 – 0.80)	0.95 (0.94 – 0.97)	-
T/R MDT	4.98 (4.52 – 5.43)	1.00 (0.89 – 1.11)	-

Tabla 6. Parámetros de disolución en medio pH 6.8 con su respectivo coeficiente de variación informado entre paréntesis y cocientes test/referencia con el intervalo de confianza al 90% informado entre paréntesis (límite inferior - límite superior). Se expresan los resultados con un criterio de dos cifras significativas en posición decimal.

d. Modelización empírica de los perfiles de disolución de las formulaciones de uso veterinario de furosemide para administración por vía oral

La cinética de disolución de furosemide de los productos veterinarios (PV) para cada uno de los pH de los medios biorrelevantes fue estudiada posteriormente y ajustada por regresión no lineal utilizando modelos de disolución empíricos. El modelo de mejor ajuste global se eligió utilizando criterios estándar como la inspección gráfica visual, el mayor valor de coeficiente de determinación R^2 ajustado y el menor valor del criterio de información de Akaike (AIC). El tratamiento de datos se realizó utilizando el programa DDSolver (Zhang et al., 2010).

Se seleccionó el modelo Gompertz (Dash et al., 2010; Moore y Flanner, 1996) como modelo de ajuste de los perfiles de disolución en forma global para ambas formulaciones a pH 1.2, 4.5 y 6.8 parametrizado en alfa (α) o parámetro de escala (scale), beta (β) o parámetro de forma (shape) y porcentaje de disolución máximo (% Dis max) de acuerdo a la siguiente ecuación matemática:

$$\% Dis (t) = \% Dis max . e^{-\alpha} . e^{-\beta \cdot \log (t)}$$

Ecuación 5. Ecuación del modelo de Gompertz. %Dis (t) representa el porcentaje disuelto de furosemide para cada uno de los tiempos de muestreo y el tiempo en minutos. El parámetro alfa (α) determina la cantidad disuelta a tiempo $t=1$ y el parámetro beta (β) denota la tasa de disolución por unidad de tiempo.

Se presentan en la siguiente tabla los valores de los parámetros de la modelización Gompertz para los perfiles de disolución de ambas marcas comerciales en los tres medios de disolución estudiados:

	pH	α		β		% Dis max (%)	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
PV1	1.2	414.33	32.91	3.56	0.44	5.67	0.54
	4.5	13.83	1.66	2.47	0.05	27.15	1.34
	6.8	16.72	1.62	2.73	0.05	98.89	5.38
PV2	1.2	8.00	1.62	2.43	0.17	46.33	0.41
	4.5	3.72	1.27	2.11	0.15	96.29	2.45
	6.8	0.60	0.27	1.23	0.16	102.15	0.70

Tabla 7. Parámetros de la modelización de Gompertz (media y desviación estándar) para los perfiles de disolución de las formulaciones test y referencia de furosemide para administración oral en perros.

Se simularon posteriormente los perfiles de disolución de las formulaciones de uso veterinario para cada uno de los pH de trabajo, obtenidos luego de la parametrización con los valores estimados para la ecuación matemática del modelo de Gompertz. Estos perfiles son expresados por una función continua que permite ser incorporada al programa PK-Sim® los valores de porcentaje disuelto en función del tiempo en forma continua para los tiempos desde 0 a 120 minutos, evitando la ausencia total de información acerca del

porcentaje disuelto de principio activo en los intervalos generados entre los tiempos de muestreo y lográndose un proceso de “suavizado” de la cinética de disolución que evita saltos muy elevados en los valores de porcentaje de disolución entre dos tiempos de muestreo determinados.

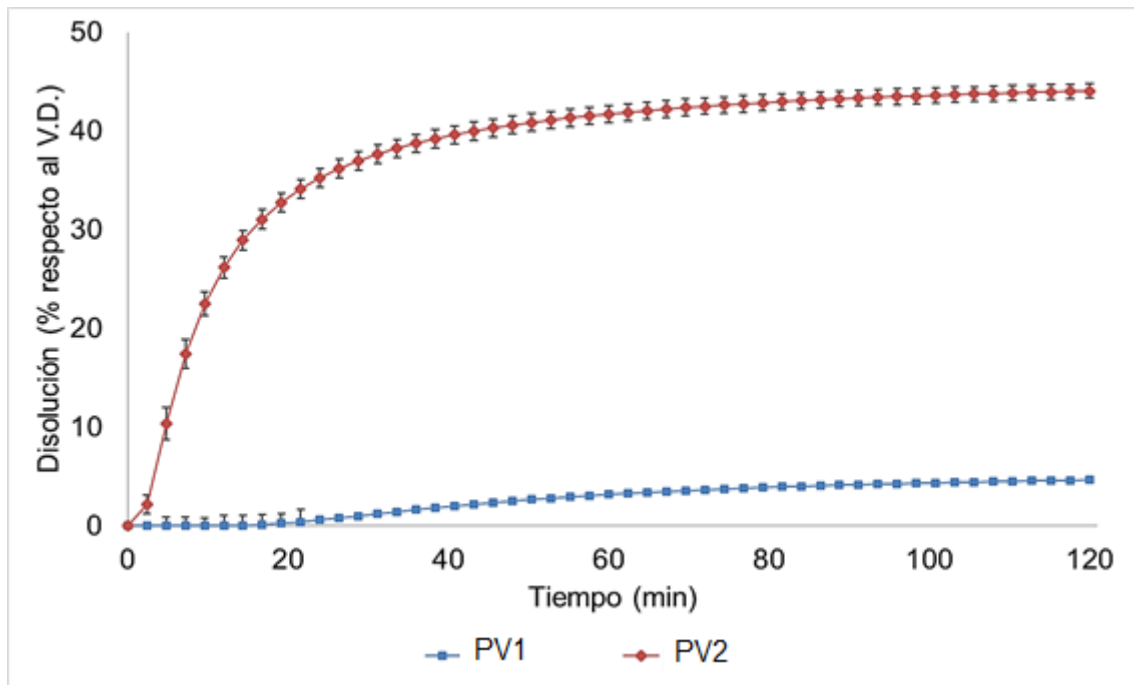


Figura 5. Perfiles de disolución simulados en medio pH 1.2 para las formulaciones veterinarias graficado como porcentaje disuelto (con su correspondiente SD) respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo.

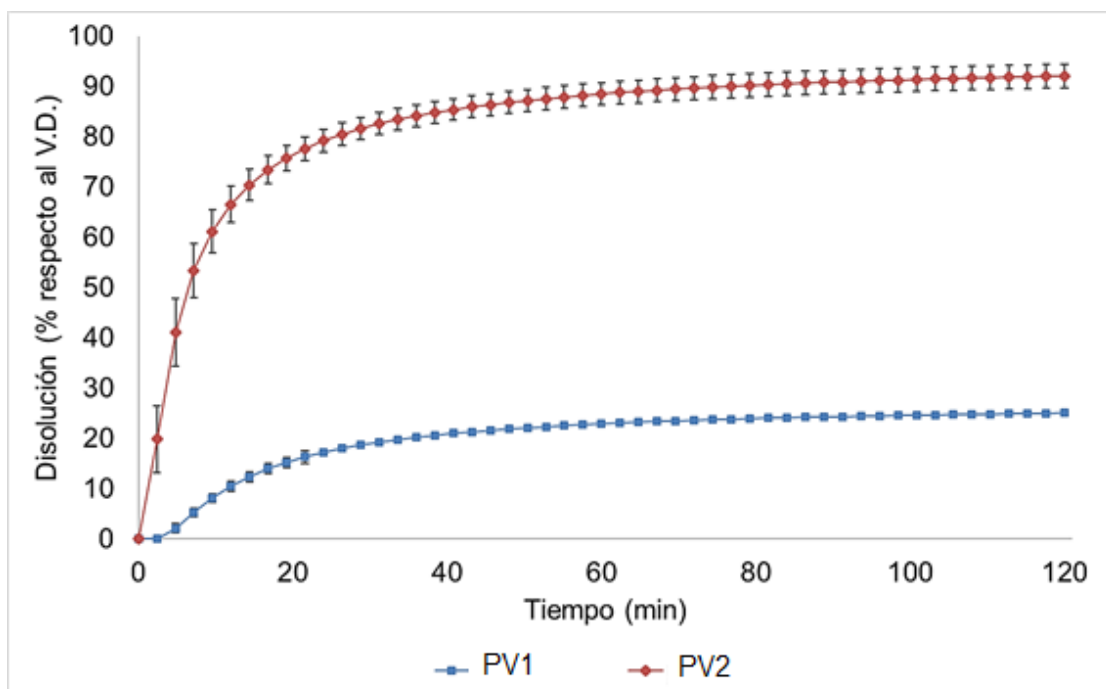


Figura 6. Perfiles de disolución simulados en medio pH 4.5 para las formulaciones veterinarias graficado como porcentaje disuelto (con su correspondiente SD) respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo.

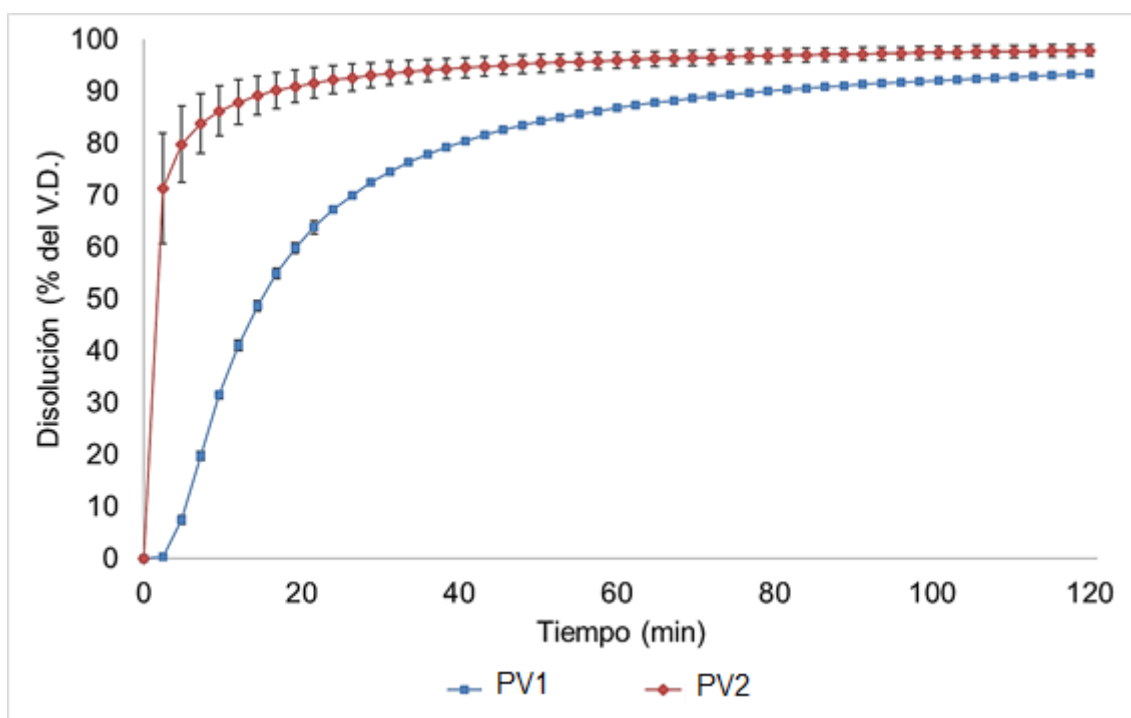


Figura 7. Perfiles de disolución simulados en medio pH 6.8 para las formulaciones veterinarias graficado como porcentaje disuelto (con su correspondiente SD) respecto al valor declarado de principio activo en función del tiempo.

Una vez obtenida la descripción de datos a través de los perfiles de disolución simulados por DDSolver®, se procede a realizar el gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED). Este gráfico muestra las observaciones de porcentaje de disolución de furosemide (valores obtenidos experimentalmente en los ensayos de disolución) en función de los valores calculados a través de los parámetros estimados en la modelización de la cinética de disolución (α , β y % Dis max). El gráfico es útil para evaluar el comportamiento del modelo empírico en cuanto a la bondad de ajuste, detectar errores de especificación o parámetros en el modelo y visualizar valores atípicos. Los gráficos obtenidos son presentados a continuación:

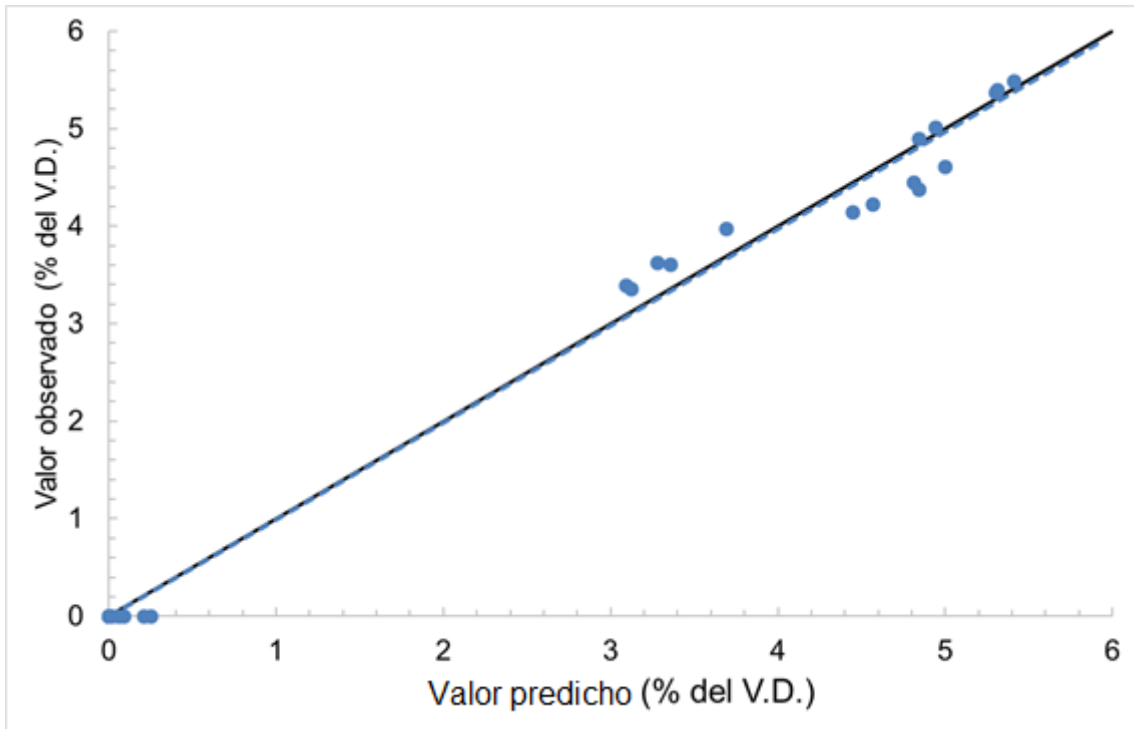


Figura 8. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV1 a pH 1.2 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

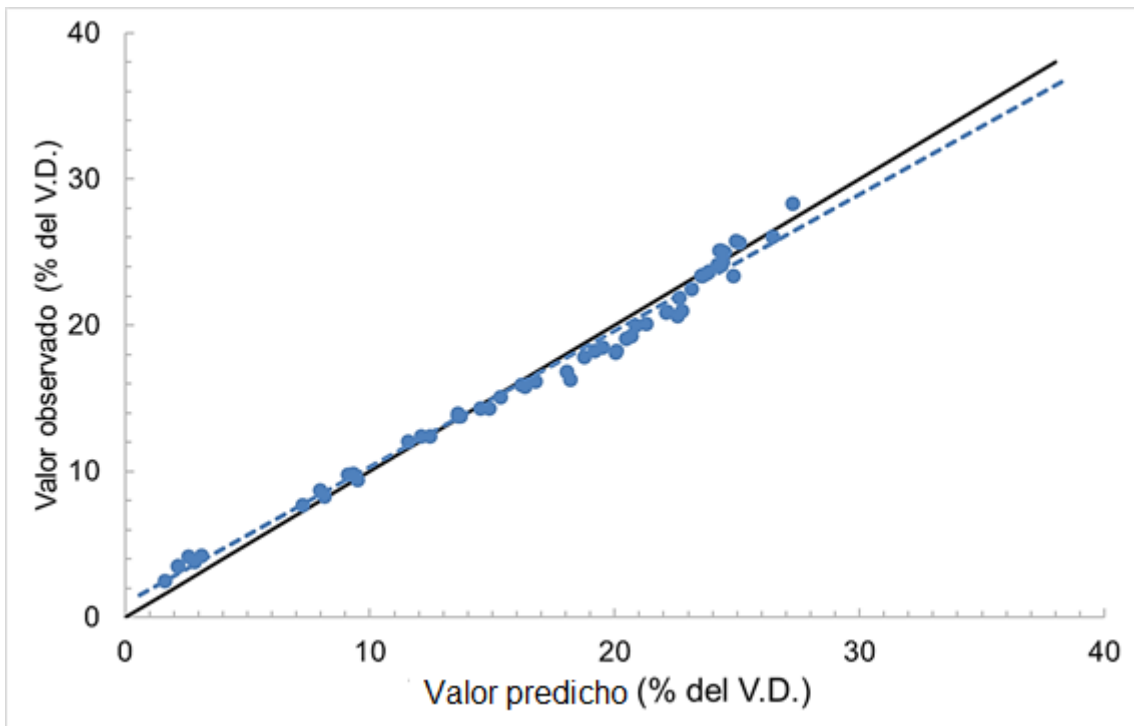


Figura 9. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV1 a pH 4.5 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas.

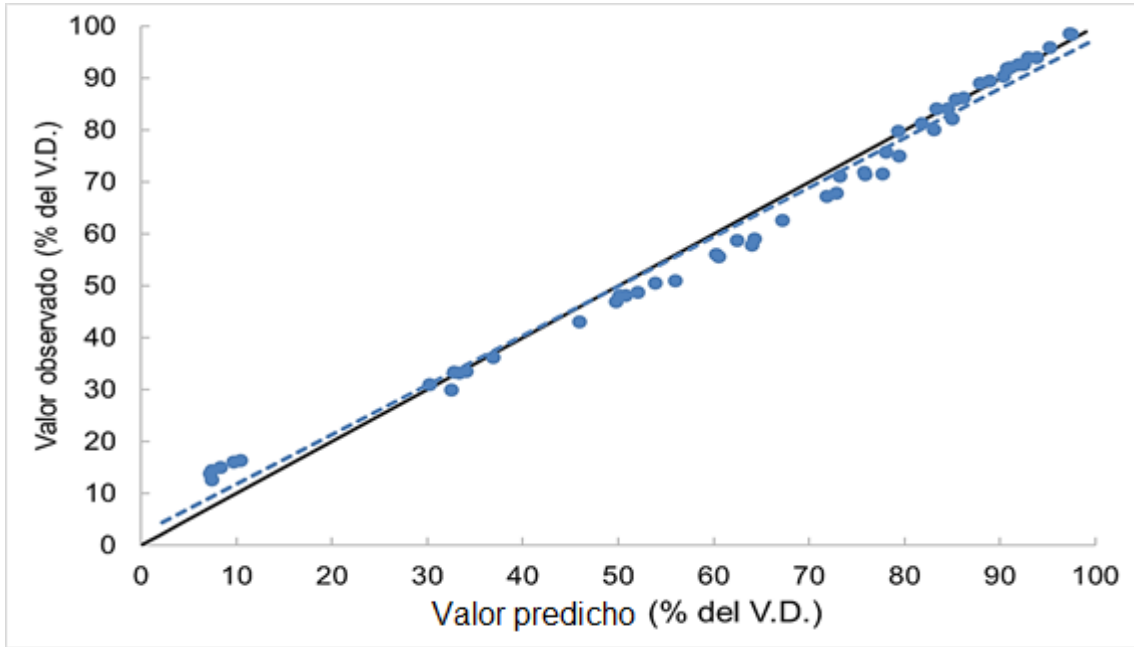


Figura 10. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV1 a pH 6.8 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

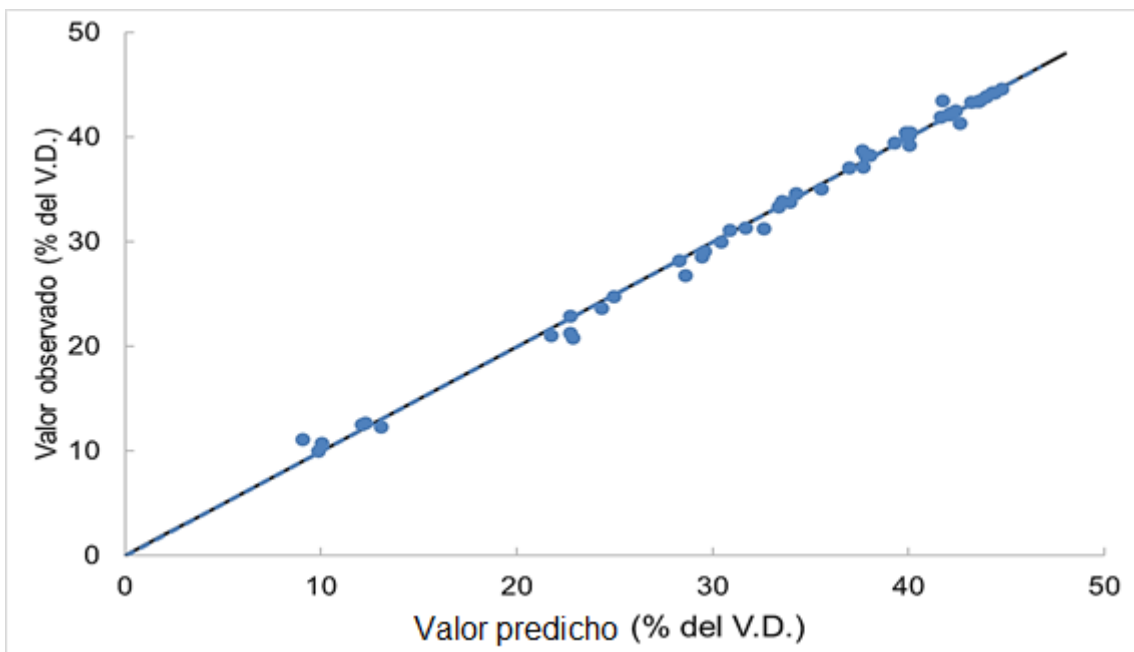


Figura 11. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV2 a pH 1.2 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

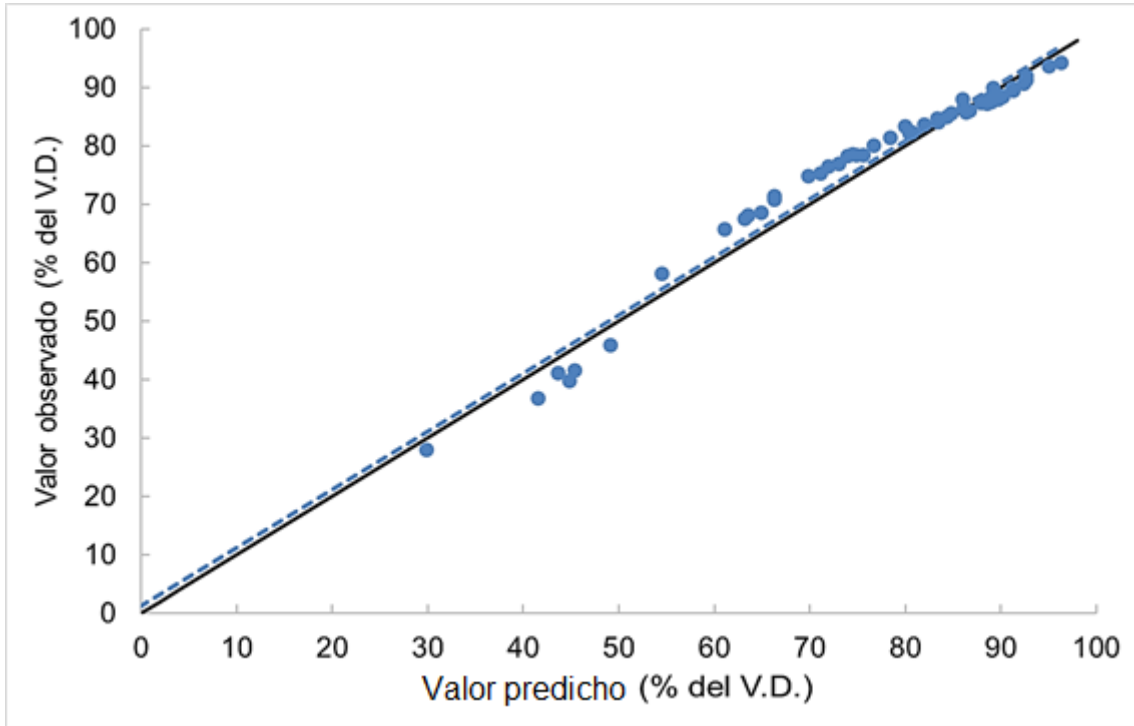


Figura 12. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV2 a pH 4.5 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

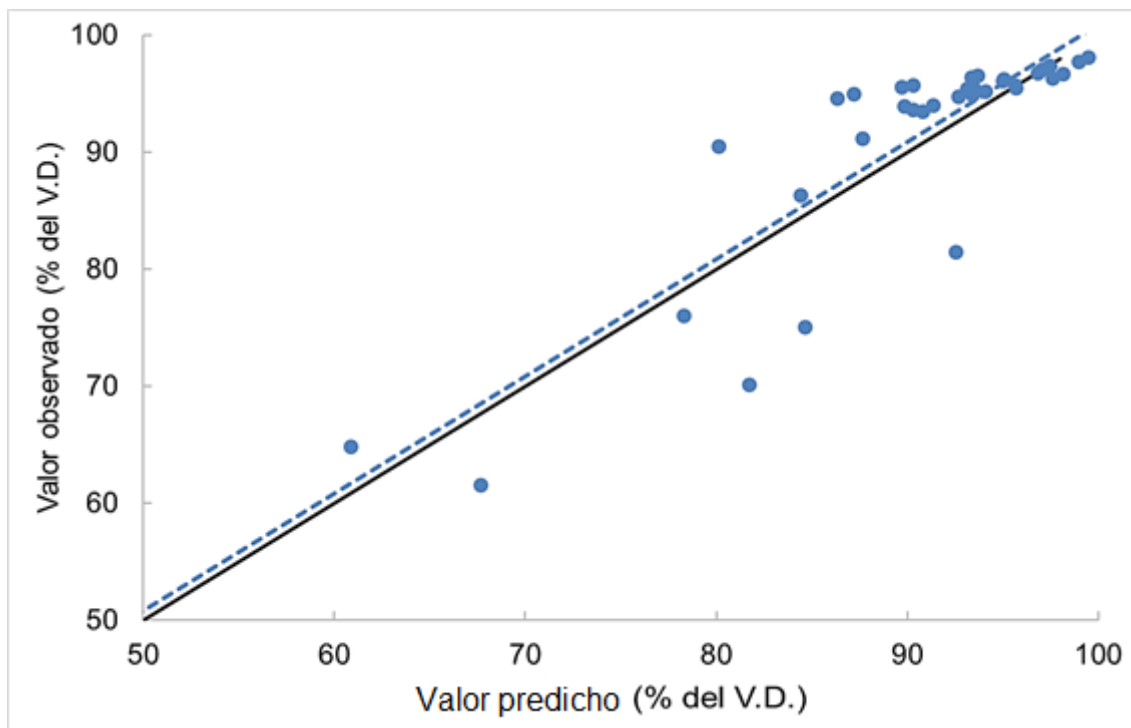


Figura 13. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para la disolución de la formulación PV2 a pH 6.8 (marcadores en azul) con porcentaje de disolución predicho en el eje de las abscisas y porcentaje de disolución observado experimentalmente en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

iv. Ensayos de desintegración de comprimidos de liberación inmediata conteniendo furosemide como único principio activo.

Los ensayos de desintegración consisten en procedimientos experimentales para determinar si comprimidos (o gránulos) se desintegran dentro de un tiempo establecido colocados en un medio en estado líquido a determinada temperatura y en ciertas condiciones experimentales. Las condiciones de estos ensayos son descritas en farmacopea, tomándose como referencia la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) pero se encuentran además armonizadas con la Farmacopea Europea (EP) y la Farmacopea Japonesa. Dentro de las características más importantes de los comprimidos que pueden afectar la disolución del principio activo se incluyen: el tipo de liberación (inmediata, retardada, modificada, etc.) y la velocidad de desintegración afectada por parámetros farmacotécnicos como ser la friabilidad, la dureza y los excipientes en su

formulación (González Y., 2017). El ensayo de desintegración fue la primera prueba biofarmacéutica incluida oficialmente en farmacopea, siendo en la helvética en el año 1934 y luego seguida por la americana en 1950 (Matiz Melo, G. y Rodríguez Cavallo, E., 2015). De acuerdo a la ley de disolución de Noyes-Whitney, la superficie de contacto entre el soluto y el solvente es una variable crítica para la velocidad de disolución. (Noyes A. y Whitney W., 1897). Por lo tanto, es de suma importancia analizar el proceso de desintegración de los comprimidos además del posterior ensayo de disolución debido a que una velocidad de desintegración deficiente impactará negativamente en el proceso de disolución del principio activo en los medios de interés.

Se realizaron los ensayos de desintegración para los comprimidos de furosemide de acuerdo a las condiciones establecidas en el capítulo 701 de la USP. El tiempo de desintegración se registró manualmente utilizando cronómetro. (USP 39-NF 34 capítulo <701> - Métodos fisicoquímicos). Se colocaron seis comprimidos de un mismo lote de cada una de las tres marcas comerciales en el equipo de desintegración BTF028 del laboratorio BIOTEFA del Polo Tecnológico de Pando, Montevideo de la Facultad de Química. En farmacopea se especifica el límite establecido de desintegración según las monografías individuales, sin embargo en el presente ensayo se utilizó además un criterio orientador y que permitió comparar entre la desintegración de los comprimidos de las diferentes marcas comerciales. Para el caso de furosemide en la forma farmacéutica comprimidos no está codificado en su monografía individual el tiempo de desintegración, sin embargo es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de los comprimidos en general (Sacchetti, M. et al., 2017). El aparato utilizado para el ensayo de desintegración consta de un montaje de canastilla-gradilla, un vaso de precipitados de 1000 mL de paredes bajas, con una altura entre 138–160 mm y con un diámetro interno de 97–115 mm para el líquido de inmersión, una disposición termostática y un dispositivo para elevar y sumergir la canastilla en el líquido de inmersión a una frecuencia constante. El montaje de canastilla-gradilla consiste en 6 tubos transparentes abiertos en sus extremos de 75-80 mm de longitud cada uno de ellos y las dimensiones del montaje en el equipo se ajustan a la USP vigente. El procedimiento del ensayo para comprimidos de liberación inmediata consiste en colocar una unidad de dosificación en cada uno de los 6 tubos del montaje de canastilla-gradilla, poner inmediatamente en funcionamiento el aparato (con cronometración), utilizando agua destilada (en caso de no especificarse otro

medio en la monografía correspondiente) y mantener a $37 \pm 2^\circ$. Al final del tiempo especificado levantar el montaje del equipo y proceder al lavado del mismo (USP 39-NF 34 capítulo 701 - Métodos fisicoquímicos). Una vez iniciado el ensayo, se registraron los tiempos en los cuales por inspección visual se observó una desintegración parcial pero superior al 50% para todos los comprimidos en conjunto y por otro lado los tiempos finales para cada uno de los seis comprimidos que indican la desintegración total, es decir la ausencia de núcleos sólidos notables de la forma farmacéutica sólida.

Para los comprimidos de EFA® y del producto veterinario 2 (PV2) se observó que a los 1.5 minutos la desintegración fue superior al 50% para todos los comprimidos. Para el caso del producto veterinario 1 (PV1) se analizó a los 2 minutos, 4 minutos y 6 minutos, siendo este último tiempo en el cual se observó una desintegración superior al 50% para cinco de los seis comprimidos ensayados. Luego a los 6.5 minutos la desintegración es superior al 50% para todos los comprimidos de esta marca comercial.

El tiempo de mayor interés a determinar fue el tiempo en el cual para cada uno de los seis comprimidos de las tres marcas comerciales ensayadas se verificó la desintegración total. Se midieron estos tiempos y se procedió a calcular la mediana por marca comercial y comparar los rangos informados como valor mínimo observado – valor máximo observado en el procedimiento experimental. Se adjuntan en la siguiente tabla los resultados de los ensayos anteriormente descritos:

Producto	Tiempo (min)						Mediana (min)	Rango (min)
	C1	C2	C3	C4	C5	C6		
EFA®	2.0	1.9	1.8	1.9	1.8	2.2	1.9	1.8 – 2.2
PV2	2.3	2.3	2.4	2.4	2.3	2.4	2.4	2.3 – 2.4
PV1	10.1	10.0	10.1	10.0	10.1	10.3	10.1	10.0 – 10.3

Tabla 8. Resultados de tiempos de desintegración total en minutos para los comprimidos numerados desde C1 a C6 (comprimido uno a comprimido seis) con mediana y rango (valor mínimo observado – valor máximo observado) por marca comercial.

v. Principales aportes del capítulo y conclusiones

En la evaluación realizada de tres formulaciones orales de furosemide mediante ensayos de disolución *in vitro* en condiciones biorrelevantes en aparato disolutor USP II siguiendo las guías de estudios de bioequivalencia para productos veterinarios del Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento (EMA/CVMP, 2021) se destaca que de las dos formulaciones veterinarias analizadas, únicamente el producto veterinario 2 (PV2) presentó una performance de disolución similar al producto de referencia. A priori se observaron diferencias importantes en el rendimiento *in vitro* por inspección visual de los gráficos de los perfiles de disolución a pH 1.2 de los comprimidos del producto veterinario 1 (PV1) frente a las otras dos formulaciones ensayadas, presentando un porcentaje disuelto marcadamente inferior de principio activo. El mismo no supera el 2.0% de eficiencia de disolución a pH 1.2 y el 20% a pH 4.5.

Las diferencias en los parámetros de disolución calculados (eficiencia de disolución, tiempo medio de disolución y factor f_2) son máximas a pH ácido. Teniendo en cuenta esto es, posible prever que utilizando los perfiles de disolución a pH 1.2 en el diseño de un modelo farmacocinético para furosemide en perros se genera un mayor impacto en el proceso de absorción y diferencias mayores en las concentraciones plasmáticas de las curvas farmacocinéticas, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas y la existencia de una ventana de absorción de acuerdo a la relación pH/pKa. Partiendo desde un enfoque farmacocinético basado en fisiología, en nuestro caso los perfiles de disolución a pH 1.2 son de particular relevancia puesto que son claves en el diseño del modelo de absorción teniendo en cuenta que este proceso se da para furosemide en forma mayoritaria en la primera porción del duodeno del animal luego de la ingesta de los comprimidos de liberación inmediata por vía oral conteniendo este principio activo. El ajuste del modelo de Gompertz para los pH 1.2 y 4.5 fue óptimo y se visualiza en los gráficos OBSvsPRED en la distribución de puntos en torno a la línea de tendencia y en relación con la función identidad. Puede observarse que el ajuste para el pH 6.8 no se da de forma óptima y para una de las formulaciones los puntos del gráfico y la línea de tendencia determinada por ellos presentan un mayor alejamiento de la función identidad,

el modelo Gompertz no es el más apropiado para este valor de pH debido a que las formulaciones alcanzan mayormente la disolución total y se podría seleccionar otro modelo empírico específicamente para explicar este alejamiento, sin embargo se prefiere mantener la modelización de Gompertz para utilizar un único modelo en forma global y se sabe además por las propiedades fisicoquímicas del fármaco en estudio y su ventana de absorción, que la disolución en medio biorrelevante a pH 6.8 no será relevante debido a que la absorción de furosemide en las porciones más distales del intestino no es significativa.

Por otro lado la formulación que presentó la performance menos adecuada a comprimidos de liberación inmediata para el principio activo de estudio en los ensayos de disolución también resultó ser la que presenta mayores tiempos de desintegración en los ensayos de desintegración realizados, pudiendo detectar que los problemas de disolución de la formulación pueden deberse a dificultades en el proceso de desintegración de la forma farmacéutica. La mediana del tiempo de desintegración para el PV1 es más de cinco veces mayor que para la formulación de referencia (un 532% en valor relativo) mientras que la formulación PV2 presenta una mediana que representa un 126% del valor de la formulación de referencia y teniendo en cuenta el rango el apartamiento en los tiempos es muy reducido, destacándose un valor máximo de 2.2 minutos para EFA® y un valor mínimo de 2.3 minutos para PV2 en los tiempos de desintegración.

Capítulo 3. Modelado PBPK utilizando el software PK-Sim®

En este capítulo se presenta el diseño del modelo farmacocinético basado en fisiología (PBPK) para furosemide en perros utilizando los software de modelado PK-Sim® y Mobi® con el objetivo de desarrollar un modelo *in silico* predictivo que permitiese explicar los resultados experimentales *in vivo* en perros sanos y predecir las diferencias entre formulaciones observadas en el ensayo de bioequivalencia así como también predecir la biodisponibilidad relativa entre los dos productos locales ensayados de furosemide para administración oral en perros por medio de un modelo biofarmacéutico con base fisiológica (PBBM) integrando los parámetros relacionados con cada formulación estimados a través de las pruebas *in vitro* y la información bibliográfica pertinente.

i. Diseño del modelo PBPK por integración *in silico* de parámetros fisicoquímicos e información bibliográfica de furosemide en perros

Todas las simulaciones farmacocinéticas fueron realizadas utilizando el software PK-Sim® v11.0 (Alemania), que implementa un modelo PBPK de cuerpo completo multicompartimental que consta de múltiples compartimentos sanguíneos y 15 órganos o tejidos para el caso de moléculas pequeñas: tejido adiposo, cerebro, hueso, gónadas, corazón, riñones, intestino grueso, intestino delgado, hígado, pulmón, músculo esquelético, páncreas, piel, bazo, estómago, compartimentos sanguíneos de sangre arterial, sangre venosa y sangre de la vena porta (Niederalt et al., 2018). A su vez el intestino es caracterizado por otros 12 compartimentos que separan segmentos intestinales, pared intestinal y circulación portal. Gracias a su conformación multicompartimental PK-Sim® es capaz de describir los fenómenos de absorción (incluyendo administración por vía oral de formas farmacéuticas sólidas), distribución, metabolismo y excreción integrados completamente en una única simulación por modelo. Cabe destacar que la estructura compartimental del modelo posee un ordenamiento que respeta las conexiones anatómicas y los procesos fisiológicos de los animales representados, permitiendo reflejar los procesos farmacocinéticos de forma mecánica, y ganando así capacidad predictiva que aporta confianza a las simulaciones realizadas (Willman et al., 2003).

Con el uso de este software libre se realizó un modelado PBPK para perros tomando la raza Beagle como referencia para la extracción automatizada de datos genéticos de expresión enzimática y luego extrapolado a la especie de interés sin raza de referencia, asignada en el software a partir del individuo “dog” como generador de la población de estudio en lugar del individuo “Beagle” con dicho objetivo. Se utilizó la base de datos de expresión de genes y enzimas versión beta publicada en Open Systems Pharmacology en febrero de 2022. Todas las anotaciones de genes de esta base de datos se realizaron con el paquete biomaRt (Durinck et al., 2009) y se basan en identificadores de genes (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) NCBI y ensamblajes de los mismos. Para las especies animales como en este caso, las bases de datos incluyen la expresión enzimática animal y un enlace de relacionamiento hacia la expresión enzimática humana para determinado gen. Los datos de origen de la base de datos se basan en RNAseq (Secuenciación del ARN) derivados de muestras de tejido primario sano recopiladas de fuentes bibliográficas (revistas y publicaciones científicas). BiomaRt forma parte de un proyecto científico comunitario que reúne en un punto de acceso un enorme número de datos publicados de investigaciones científicas (principalmente biológicas y biomédicas) y aporta un software de código abierto que fue desarrollado en el Instituto Europeo de Bioinformática y provee una óptima gestión de datos del genoma humano y otras especies (Kasprzyk et al., 2011).

Los parámetros fisiológicos predeterminados en PK-Sim® y específicos de la especie canina se obtuvieron de la literatura en el proceso de desarrollo del software y representan un perro sin raza definida donde las diferencias en expresión enzimática entre razas no es tenida en cuenta. Aun así, para la raza de perros más utilizada para estudios pre-clínicos a nivel farmacéutico, el beagle, se implementa información anatómica y fisiológica que representa específicamente a un perro beagle adulto de 10.5 kg de peso promedio por defecto (Andersen, 1970), que puede ser escalado para las simulaciones a realizar. Para el desarrollo del modelo se comienza trabajando con perfiles farmacocinéticos y análisis individuales, desde la raza beagle con su base genética y enzimática cargada, aportando datos de la bibliografía sobre la farmacocinética de furosemide en perros y para lograr una representación más ajustada se seleccionan estudios que se hayan realizado en perros beagle (Koh et al., 2021; Lee et al., 1986), manteniendo así una correlación de raza entre los parámetros predeterminados en el programa computacional y los datos numéricos y/o

gráficos brindados por la bibliografía científica. En su conjunto el modelo biofarmacéutico basado en fisiología es construido a través de parámetros enteramente dependientes del organismo que son definidos por el software y pueden sufrir modificaciones por el usuario (por ejemplo el peso corporal), parámetros dependientes del fármaco que pueden ser fisicoquímicos o biológicos (como ser la permeabilidad intestinal o la fracción libre de fármaco en sangre) y parámetros dependientes de la formulación que son determinados con ensayos *in vitro* biorrelevantes para la especie de trabajo (a destacar, la velocidad de disolución a lo largo del tracto gastrointestinal en condiciones fisiológicas).

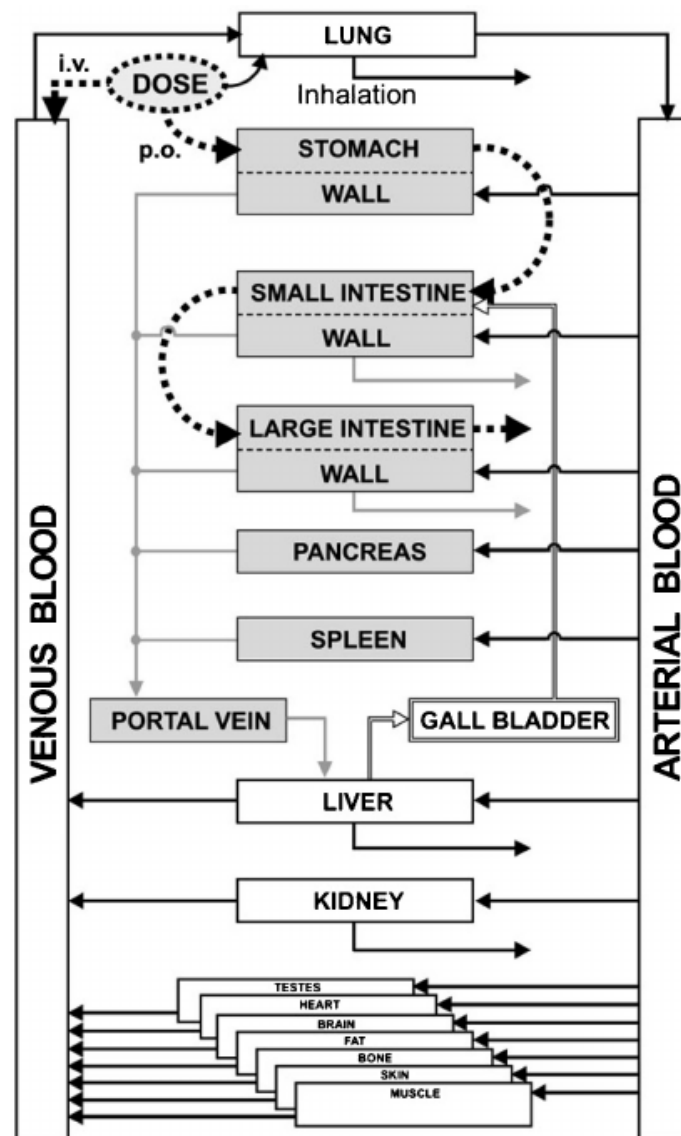


Figura 14. Representación esquemática de la estructura relacional y espacial del modelo para cuerpo completo de la simulación en PK-Sim® con los órganos y tejidos considerados (Pelkonen et al., 2008).

En el modelado se generó inicialmente el compuesto “furosemide” utilizando parámetros químicos, físicos y biológicos de la bibliografía científica así como además se estudian modelos *in silico* de tipo PBPK realizados previamente para el compuesto en humanos (Britz et al., 2020). En la siguiente tabla se adjuntan los parámetros incorporados al modelo en la sección de “molécula” y la referencia bibliográfica correspondiente de la cual se tomaron los valores para dichos parámetros:

Parámetro	Valor y unidad de medida	Referencia bibliográfica
Masa molar	330.74 g/mol	National Center for Biotechnology Information, 2022.
pKa (ácido)	3.5	Nielsen, L. H. et al., 2015.
pKa (base)	9.9	Nielsen, L. H. et al., 2015.
logP	2.3	Markovic, M. et al., 2020.
UPP (Albúmina)	91%	Cohen MR. et al., 1976.
Solubilidad en (ac)	3201 mg/L (a pH 6.5)	Takács-Novák, K., 2013.
Permeabilidad Caco-2	3.7×10^{-7} cm/s	Flanagan et al., 2002

Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos incorporados al modelo *in silico* con sus respectivos valores, unidades de medida y referencias bibliográficas correspondientes.

A pesar de informar la masa molar del compuesto, PK-Sim® trabaja en el modelado farmacocinético con la masa molecular efectiva en lugar de la masa molecular. Con este objetivo se debe informar en el software la presencia de halógenos (en este caso 1 átomo de cloro en la molécula de furosemide) para el cálculo del peso molecular efectivo en base a la siguiente corrección:

$$MW_{eff} = MW - N \cdot CF$$

Ecuación 6. Determinación del peso molecular efectivo utilizada. MW_{eff} representa el peso molecular efectivo, MW el peso molecular, N el número de átomos de halógenos en la molécula y CF el factor de corrección según el halógeno, siendo $CF=17$ para flúor, $CF=22$ para cloro, $CF=62$ para bromo y $CF=98$ para iodo.

Esta corrección es aplicada automáticamente por el programa y desarrollada por el mismo a partir de un modelo fisiológico para simular computacionalmente el flujo gastrointestinal y la absorción de fármacos en ratas (Willman, 2003), extrapolado posteriormente a las especies de interés como ser la especie humana y la especie canina por ejemplo. El ajuste de peso molecular efectivo en este caso tiene en cuenta la pequeña contribución de los halógenos al volumen molecular en relación con su peso atómico.

Para realizar la simulación farmacocinética de los procesos de absorción y disposición es de vital importancia para el programa la incorporación de los datos de solubilidad y unión a proteínas plasmáticas respectivamente. Furosemide se une ampliamente a las proteínas plasmáticas, en especial a la albúmina (Cohen et al., 1976.). La solubilidad en solución acuosa aumenta a medida que aumenta el pH desde valores reportados de 0.18 mg/mL a pH 2.3 hasta 13.36 mg/mL a pH 10.0 (Devarakonda et al., 2007). A pH 6.5 se informa una solubilidad de 3201 mg/L (Takács-Novák, 2013). La curva de solubilidad correspondiente es ingresada entonces en el software en formato de tabla especificando el valor de solubilidad y el pH del medio para el cual se determinó dicho valor de bibliografía.

La permeabilidad intestinal específica como parámetro del fenómeno de absorción del fármaco fue calculada por ecuaciones paramétricas por el software a partir del peso molecular efectivo y la lipofilia de la molécula que puede ser incorporada en forma de $\log P$. Se corroboró el orden de dicha permeabilidad estimada con la referencia de permeabilidad en Caco-2. Dicha estimación refiere según el software a la permeabilidad transcelular intestinal normalizada por el área superficial de contacto de la capa más interna de la pared intestinal. Se ha demostrado que la vía de permeabilidad paracelular no es significativa en mamíferos (Thelen et al., 2011) y por lo tanto no es tomada en cuenta por el programa para el cálculo de permeabilidad intestinal específica en forma

automática, aunque si puede ser incluida por el usuario en forma manual en casos específicos que así lo requieran. El enfoque mecanístico-matemático de los modelos PBPK se puede utilizar para predecir parámetros y diferencias regionales en la absorción intestinal en perros con precisión aceptable y por lo tanto puede sustituir en gran medida los estudios *in vivo* de absorción regional con el fármaco estudiado (Eckernäs et al., 2021). Para ácidos y bases, la permeabilidad intestinal transcelular es calculada dinámicamente a lo largo de todo el tracto intestinal en función del pH fisiológico de la especie en estudio de los segmentos intestinales. Por defecto el software establece que el efecto del pH sobre la permeabilidad intestinal se refleja en la afinidad de membrana utilizada como entrada en el proceso de absorción, por esta razón la permeabilidad intestinal específica se visualiza como un valor constante en el sistema a lo largo de los diferentes segmentos intestinales. Por otro lado se supone que la permeabilidad es proporcional al coeficiente de partición y difusión, el último de los cuales depende de la lipofilia y el peso molecular efectivo del compuesto en estudio (Kawai et al., 1994), pudiendo además seleccionar diferentes modos de cálculo en el software en función de las necesidades y el conocimiento técnico-específico del usuario.

El diseño del modelo farmacocinético para predecir la disposición de furosemide en el organismo canino, se realizó inicialmente a partir de la transposición entre especies en base al modelo PBPK para furosemide desarrollado en PK-Sim® por Britz H. y colaboradores en el año 2020 para predecir las interacciones a nivel de transportadores entre los fármacos probenecid y furosemide (Britz et al., 2020). La estrategia del desarrollo del modelo PBPK inicia con un modelo humano para furosemide y se proyecta la transposición a la especie de interés a partir de datos reportados en la bibliografía sobre la farmacocinética de furosemide en perros en una primera instancia de administración intravenosa y en una segunda instancia de administración por vía oral. Los datos bibliográficos permiten una evaluación y desarrollo secuencial del modelo, dado que en el proceso se comienza con los procesos más simples (correspondientes a la eliminación y disposición del fármaco únicamente) y se va incorporando complejidad al modelo a medida que los parámetros farmacocinéticos que lo explican quedan validados anteriormente y describen de forma aceptable los datos experimentales incorporados.

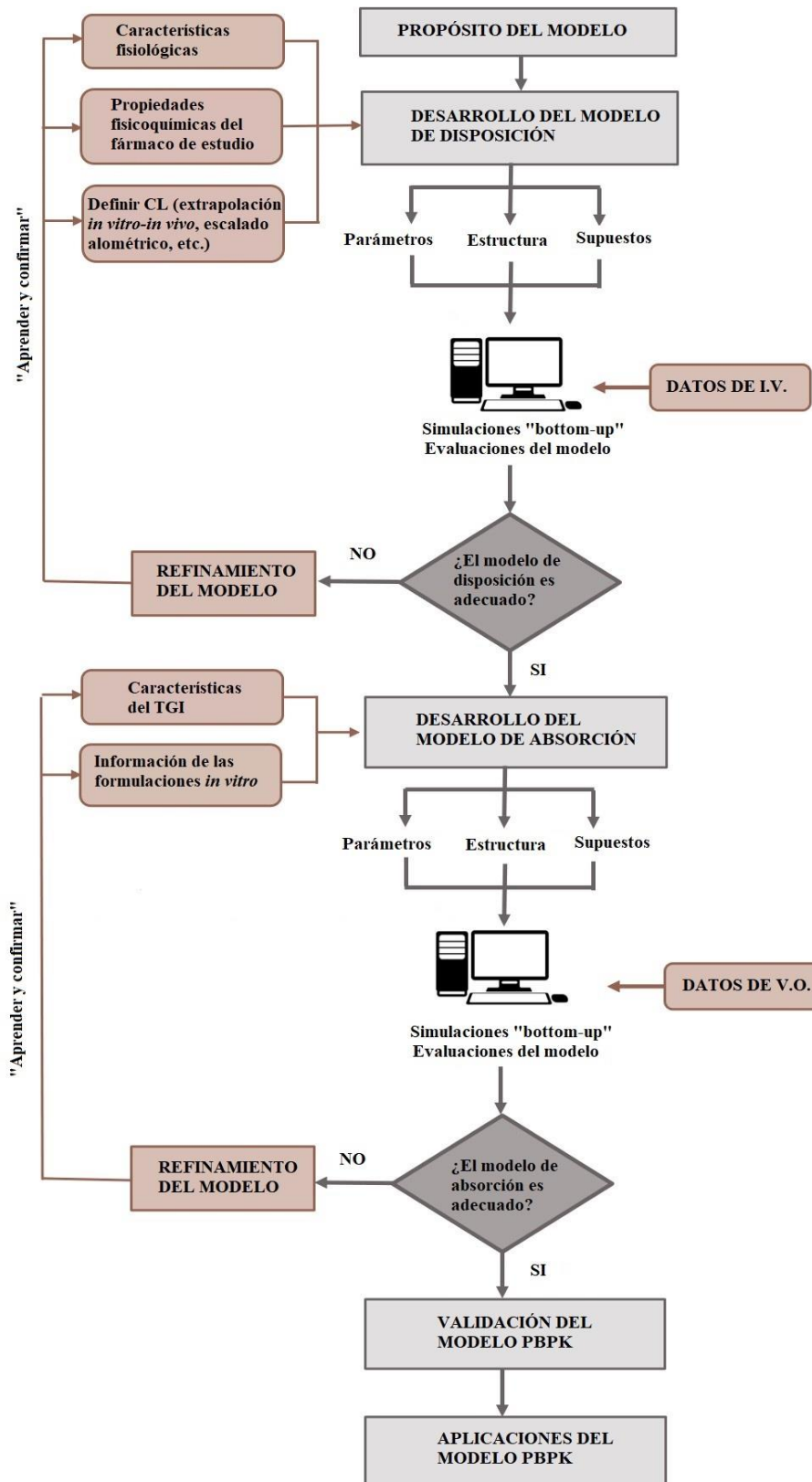


Figura 15. Representación esquemática del flujo de trabajo de desarrollo de modelo PBPK para un medicamento administrado por vía oral incluyendo las etapas fundamentales del mismo. Figura extraída de Ibarra et al. (2021) y traducida al español.

Inicialmente utilizaron algunos valores de parámetros fisiológicos y farmacocinéticos brindados por el modelo para transportadores y enzimas que participan en el metabolismo de furosemide, así como también se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica de los parámetros faltantes para completar el esqueleto del metabolismo hepático y el transporte renal del modelo. Los porcentajes de expresión enzimática para cada uno de los transportadores y enzima UGT1A9 fueron ajustados por aplicación de la base de datos genético-enzimática de perros Beagle. El metabolismo de furosemide fue modelado considerando únicamente la enzima UGT1A9 (UDP-glucuronosiltransferasa 1-9) y a su correspondiente proceso de glucuronidación.

Proteína	Km (μmol/L)	Vmax (pmol/min)	Referencia
UGT1A9	681.0	576.0	Kutsuno et al., 2013
BCRP	20.9	11296.0	Chapa et al., 2020
MRP4	28.0	9085.2	Chapa et al., 2020
OAT3	21.5	8226.8*	Ebner et al., 2015; Britz et al., 2020.
OAT1	38.9	-	Ebner et al., 2015

Tabla 10. Valores fisiológicos-farmacocinéticos iniciales para las proteínas metabolizadoras y transportadoras de furosemide utilizados en la exploración inicial del modelo para administración por vía intravenosa. El asterisco refiere a un valor calculado a partir de la constante de catálisis (kcat) en unidades 1/min del modelo farmacocinético para furosemide en plasma de Britz et al. (2020) y las concentraciones establecidas para cada uno de los transportadores. En el caso de no hallarse el valor correspondiente, se informa como un guión simple en la tabla (-).

La base del modelo *in silico* se desarrolla introduciendo los parámetros de furosemide que se muestran en las tablas presentadas anteriormente en PK-Sim® junto con el individuo o la población seleccionada para la simulación virtual así como también las formulaciones farmacéuticas caracterizadas por la dosis declarada de principio activo y por el perfil de disolución de los comprimidos en caso de ser necesario, permitiendo posteriormente el cálculo automatizado por parte del software de otros parámetros

fisicoquímicos y principalmente los parámetros fisiológicos restantes para la construcción del modelo farmacocinético.

La mayor parte de furosemide se excreta en forma incambiada por vía renal a través de la secreción tubular activa, alcanzando una fracción excretada en la orina de aproximadamente el 60% en perros mediada por transportadores de aniones orgánicos (familia OAT) como ser OAT1 codificado por el gen SLC22A6 y OAT3 codificado por el gen SLC22A8 (Hirai et al., 1992) junto con la proteína asociada a la resistencia de múltiples fármacos MRP4. El resto del fármaco se metaboliza por glucuronidación principalmente a nivel renal por la enzima UGT1A9 y el metabolismo hepático no es significativo en perros (Verbeeck et al., 1981). En el modelo de Britz se considera para el metabolismo la enzima UGT1A9 como única enzima metabolizadora significativa para el modelado PBPK de furosemide (Britz et al., 2020), se utilizaron valores de cinética enzimática provenientes de ensayos *in vitro* en microsomas hepáticos de ratones y humanos (Kutsuno et al., 2013) extrayendo así un valor de Km y Vmax como parámetros para explicar la cinética enzimática de Michaelis-Menten.

Furosemide ha sido además identificado *in vitro* como sustrato del transportador OATP2B1 codificado por el gen SLCO2B1 en líneas celulares caninas del tipo MDCK (Madin-Darby canine kidney) y del transportador de eflujo MRP4 (proteína codificada por el gen ABCC4), siendo muy importantes en la absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal y MRP4 también posee una importante participación a nivel renal (Chapa et al., 2020). En estudios de mecanismos de resistencia a fármacos en medicina veterinaria se ha profundizado en las investigaciones del transportador BCRP (del inglés *breast cancer resistant protein*, en español proteína resistente al cáncer de mama) codificado por el gen ABCG2 y se reconoce ampliamente a furosemide como sustrato de dicho transportador a nivel intestinal (Zandvliet y Teske, 2015). A partir de ensayos en líneas celulares caninas del tipo MDCK que sobreexpresaban la proteína de resistencia a múltiples fármacos Pgp (glucoproteína-P) y las proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos MRP1 y MRP2, se descartó la participación significativa de los transportadores Pgp, MRP1 y MRP2 en el transporte activo de furosemide (Flanagan, 2002).

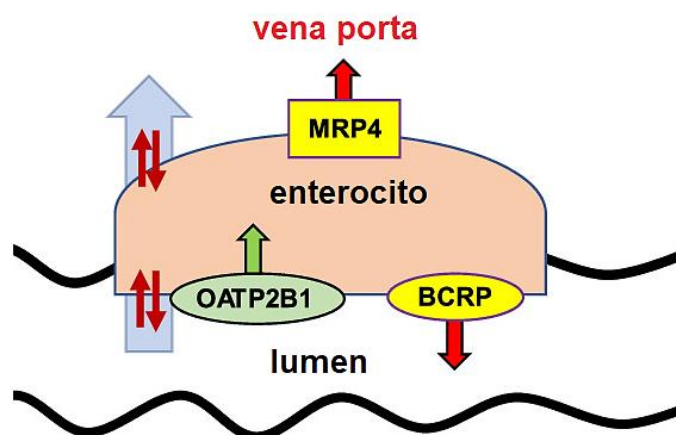


Figura 16. Transportadores de influjo y eflujo involucrados en la absorción de furosemide a nivel intestinal identificador a partir de ensayos *in vitro* con péptidos sustitutos de BCRP, MRP4 y OATP2B1 en muestras digeridas de proteínas de membrana y proteínas vesiculares de células MDCK-II (Madin-Darby canine kidney type II). Extraída de Chapa et al. (2020) y traducida al español.

Por aplicación directa del modelo PBPK de Britz (2020) a los datos *in vivo* de estudios realizados y presentados en bibliografía de furosemide en perros, se permite investigar la bondad de ajuste inicial (Koh et al., 2021; Lee et al., 1986). Los datos *in vivo* de Lee son bastante concordantes a lo observado *in vivo* en humanos en trabajos de investigación de la farmacocinética de furosemide realizados previamente en el área (Magallanes et al., 2016). Furosemide es un diurético potente y de efecto rápido, capaz de alcanzar en caninos concentraciones de estado estacionario a tiempos comprendidos entre 1 hora y media y 2 horas de comenzada una perfusión intravenosa (Lee et al., 1986). En la simulación primaria utilizando el modelo de Britz y aplicando la transposición enzimática por ajuste de las bases de datos cargadas previamente en el software, se observa que el programa PK-Sim® sobreestima la excreción urinaria de furosemide en caninos y además inicia marcadamente posterior en el tiempo (aproximadamente 120 minutos) el período de máxima excreción de furosemide en orina.

La contrastación inicial del modelo pre-establecido de la farmacocinética de furosemide en perros fue realizada con el objetivo de estudiar y evaluar la disposición del fármaco y la excreción en orina utilizando los datos *in vivo* de Lee et al. (1986) en forma individual y poblacional con pesos establecidos entre el límite inferior de 7.4kg y el límite superior de 17kg. Se utilizaron datos de concentraciones plasmáticas de furosemide para una

perfusión intravenosa de 8 horas de duración administrando a velocidad constante una dosis de 20 mg de fármaco. Las simulaciones fueron desarrolladas a partir del mismo protocolo de administración incluyendo posología y la vía de administración correspondiente, por aplicación del modelo de Britz et al. (2020) habiendo ajustado previamente los parámetros de bibliografía previamente citados en relación al fármaco en estudio y los parámetros genéticos y enzimáticos en función de la base de datos del software. Para el caso del metabolismo hepático y renal de furosemide se consideró únicamente la expresión de la enzima UGT1A9 al igual que en el modelo de referencia en humanos y la concentración de referencia a un valor de 1.0 $\mu\text{mol/L}$ estandarizada en PK-Sim® siendo luego por supuesto un parámetro a optimizar en el modelado *in silico*. A partir de los procesos de análisis de sensibilidad e identificación de parámetros en PK-Sim®, encontramos que la concentración de referencia de la enzima UGT1A9 es determinante en el metabolismo de furosemide en caninos y en las concentraciones plasmáticas observadas en función del tiempo, dado que los parámetros de K_m y V_{max} fueron fijados a partir de datos bibliográficos *in vitro* (Kerdpin et al., 2008; Kutsuno et al., 2013). A continuación se muestra la contrastación inicial del modelo PBPK frente a los datos de la perfusión intravenosa de 8 horas de furosemide en caninos de la raza Beagle presentados en bibliografía (Lee et al., 1986) para una población virtual $n=500$:

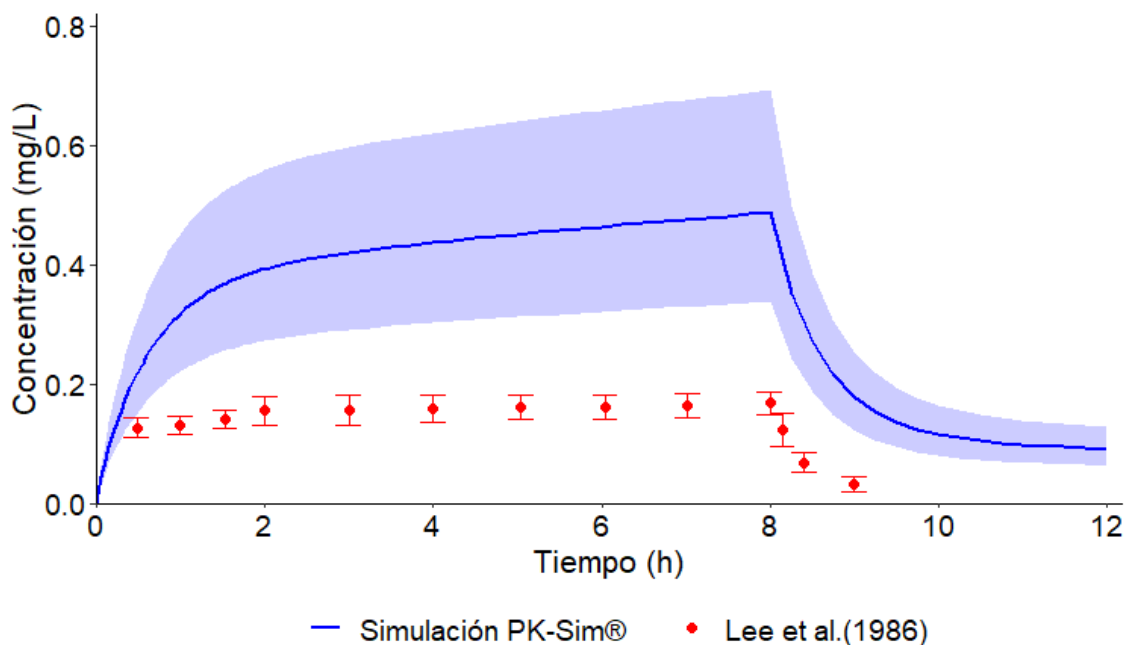


Figura 17. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle $n=500$ con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su

respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (Lee et al., 1986) de acuerdo al mismo protocolo de administración para la población en estudio (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva desviación estándar en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

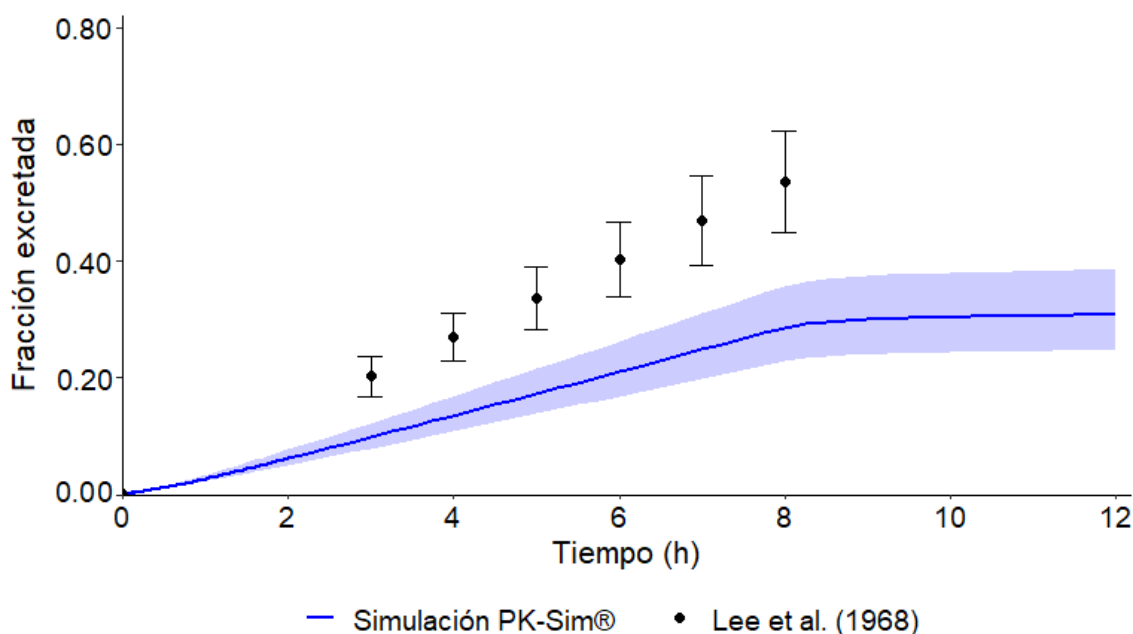


Figura 18. Simulación inicial de fracción excretada de furosemide para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4 kg a 17 kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (Lee et al., 1986) con su respectiva desviación estándar (marcadores y líneas finas en color negro).

Se observa que la simulación inicial difiere significativamente de los datos *in vivo* reportados en bibliografía para concentraciones plasmáticas de furosemide en función del tiempo en una población canina de la misma raza y teniendo en cuenta el intervalo de pesos mínimo y máximo de dicha población. El perfil farmacocinético simulado no logra predecir correctamente las concentraciones plasmáticas de furosemide y por ende la disposición del fármaco utilizando dicha contrastación bibliográfica. Bajo las mismas condiciones de simulación, se realiza el proceso de optimización paramétrica para la concentración de referencia de la enzima UGT1A9 a nivel renal y hepático en $\mu\text{mol/L}$, se trabaja en el desarrollo del modelo a nivel de la excreción renal de furosemide incorporando datos de excreción urinaria que acompañan la perfusión intravenosa de 8 horas (Lee et al., 1986) y se reevalúa nuevamente el ajuste del modelo en segunda instancia.

En la creación de los individuos de estudio, se crean en un primer paso dos individuos utilizando ambas funcionalidades citadas anteriormente de PK-Sim® que son el individuo “dog” de 13.7 kg y el individuo “Beagle” de 10.5 kg, pesos estandarizados por el software. Se trabaja siempre en la primera aproximación en forma individual, lo cual permite visualizar el ajuste de los datos observados al modelo así como también realizar los importantes procesos de análisis de sensibilidad y optimización de parámetros. Luego a partir de estos individuos, se crean las poblaciones virtuales para realizar el proceso de simulación poblacional y se seleccionan rangos de peso variables de acuerdo a la fisiología del animal y a la información bibliográfica aportada. Creamos para el trabajo una población de 500 perros en base al individuo “Beagle” para trabajar con los datos farmacocinéticos de perfusión intravenosa de furosemide de 8 horas (Lee et al., 1986) junto con los datos anexos de excreción urinaria de furosemide en orina. La variabilidad en peso para la población se establece adjudicando al límite inferior el menor peso de los animales que participaron del ensayo del cual se extraen los datos y al límite superior el mayor peso de los mismos. En los protocolos de administración, se fija en este caso una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa con 8 horas de duración tal y como cita el estudio utilizado en esta instancia de diseño del modelo.

El bloque de la fisiología renal es sobre el cual se trabajó en forma más exhaustiva para predecir el comportamiento de la eliminación renal de furosemide teniendo en cuenta su mecanismo de acción diurético y que posee también un efecto vasodilatador renal, con descenso de la resistencia vascular renal y con un aumento del flujo sanguíneo local demostrado en perros y humanos (Oppermann et al., 2007), es decir que se debió tener en cuenta una redistribución del flujo sanguíneo total hacia los riñones así como también una modificación en la secreción tubular activa de furosemide inducida por su propio mecanismo de acción vasodilatador dependiente de prostaglandinas a nivel renal (Martínez Pérez & Bermúdez Cordoví, 2014). En el modelo PBPK de furosemide en humanos utilizado como insumo inicial se trabajó únicamente con el mecanismo de excreción renal expresado como fracción de la tasa de filtración glomerular (GFR fraction) y la misma fue parametrizada con el valor numérico correspondiente a la unidad (1.00). La filtración glomerular se describe como un proceso de primer orden que describe la filtración pasiva de la fracción libre de principio activo en el plasma sanguíneo irrigando los riñones hacia la orina. En el caso de presentarse reabsorción, la fracción de

la tasa de filtrado glomerular debe ser menor a la unidad y reducirse en consecuencia según la preponderancia del fenómeno de reabsorción.

En nuestro modelo farmacocinético canino se incorpora además de la fracción de la tasa de filtrado glomerular, un mecanismo de secreción tubular activa de furosemide siguiendo una cinética de Michaelis-Menten en función de Km y Vmax (denominado TSmax en PK-Sim®). La secreción tubular se define en la sección de clearance renal como una transferencia unidireccional saturable de un compuesto hacia la orina siguiendo una cinética de tipo Michaelis-Menten. La tasa máxima específica de secreción tubular (TSmax_spec) es el parámetro que se utiliza luego en la simulación y optimizaciones y se calcula a partir de la tasa máxima intrínseca de secreción tubular (TSmax) y el volumen renal de acuerdo a la fisiología del animal con su correspondiente variabilidad según el peso corporal. En la siguiente tabla se presentan los valores de los parámetros fijados luego de la incorporación de la referencia bibliográfica correspondiente y/o el proceso de optimización de parámetros (O.P.) por simulaciones individuales en la raza Beagle aplicando en conjunto los datos de concentraciones plasmáticas junto con los datos de cantidad excretada de furosemide en orina a lo largo del tiempo para aumentar la potencia de la optimización y lograr así resultados más fiables para una misma especie y población en estudio:

Parámetro	Estimador	Unidad	Fuente
TS Km	1.45	μmol/L	O.P.
TSmax_spec	110.22	μmol/L.min	O.P.
GFR fraction	1.00	-	Britz et al., 2000.
Concentración UGT1A9	1.35	μmol/L	Britz et al., 2000 & O.P.
UGT1A9 Vmax	760.04	μmol/L.min	Kutsuno et al., 2013 & O.P.

Tabla 11. Valores fijados en el modelo para la enzima metabolizadora UGT1A9 (concentración de referencia y Vmax), fracción de la tasa de filtración glomerular y parámetros de secreción tubular activa con cinética Michaelis-Menten (TS Km y TSmax_spec).

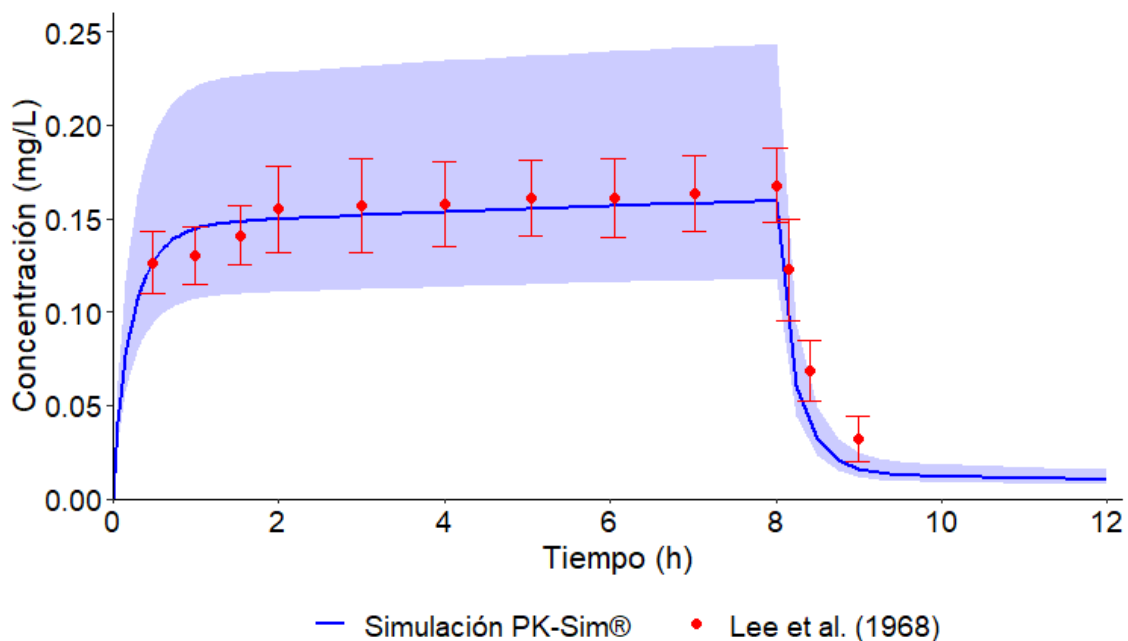


Figura 19. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4 kg a 17 kg tras una administración de 20mg de furosemide por PIV de 8 horas a velocidad constante con su respectivo intervalo de confianza al 90% (línea azul y sombreado) frente a los datos bibliográficos con correspondiente SD.

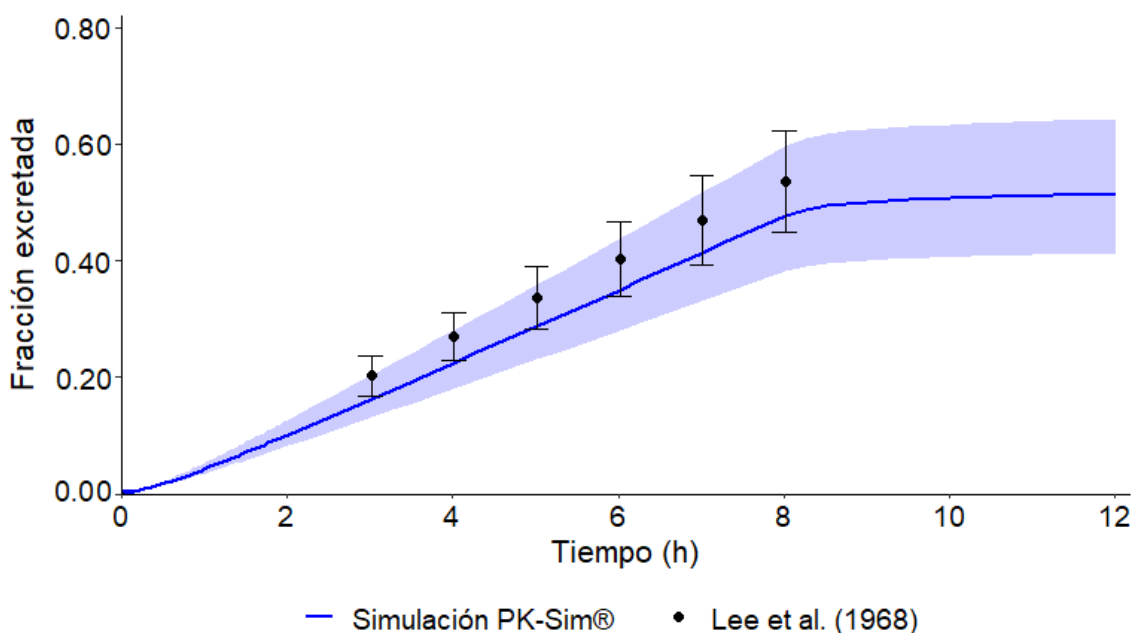


Figura 20. Simulación posterior a los ajustes presentados en la Tabla 11 para la fracción excretada de furosemide en perros Beagle (n=500) con pesos desde 7.4 kg a 17 kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul

gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (Lee et al., 1986) con su respectiva desviación estándar (marcadores y líneas finas en color negro).

El modelo farmacocinético PBPK para la simulación de la perfusión intravenosa de 20 mg de furosemide durante 8 horas a velocidad constante ajusta a los datos de bibliografía presentados para la contrastación *in vivo-in silico* y permite explicar y predecir de forma aceptable la evolución de las concentraciones de furosemide en función del tiempo y la disposición del fármaco en la población canina de estudio. Sin embargo, el modelo se optimizó posteriormente incluyendo un aumento dependiente de la concentración de furosemide en el flujo sanguíneo renal que influye en la excreción renal del fármaco pudiendo ajustar de manera óptima los datos bibliográficos de cantidad excretada de furosemide en orina (Lee et al., 1986) y debido a que para las otras velocidades de ingreso por vía intravenosa reportadas en bibliografía el modelo presentó un menor grado de ajuste. Dicha variación fue establecida en base a un modelo farmacodinámico dosis-respuesta del tipo Emax utilizando el programa MoBi®, de acuerdo a los distintos niveles de exposición al fármaco observados en la bibliografía utilizada. MoBi® es un software para la simulación y el modelado fisiológico que trabaja en conjunto con PK-Sim® y permite realizar modificaciones estructurales en la arquitectura fisiológica del modelo. El software trabaja con ecuaciones diferenciales ordinarias y es capaz de modificar modelos PBPK acabados en PK-Sim® por importación de los mismos como también exportarlos nuevamente, con diferentes módulos compartimentales que permiten acceder, manipular y extender los modelos farmacocinéticos basados en fisiología de PK-Sim® (Dallman et al., 2018).

Se trabajó en conjunto en la optimización de parámetros en simultáneo para los datos de fracción excretada en orina de la perfusión intravenosa de 8 horas citada anteriormente junto con perfiles farmacocinéticos medios para la misma población de perros expresados como concentración de furosemide en función del tiempo para perfusiones intravenosas de 20 mg de furosemide de 2 horas de duración y de 30 minutos de duración, así como también una administración intravenosa en bolo de 20 mg de furosemide. Se estudió con este conjunto de datos reportados en la bibliografía citada anteriormente la variación del flujo renal dependiente de la concentración plasmática de furosemide en perros. Cabe destacar que para las perfusiones intravenosas de 2 horas y 30 minutos de duración se seleccionaron los puntos correspondientes únicamente a la fase de eliminación en los

perfiles farmacocinéticos medios. Se tuvo en cuenta además el flujo sanguíneo renal basal medio de la población Beagle analizada como estimador de las condiciones de partida y así poder establecer el parámetro E0. El modelo Emax de mejor ajuste fue seleccionado por minimización de la suma de residuos cuadrados y se estableció de acuerdo a la siguiente ecuación matemática:

$$E = E0 + \frac{Emax * C^\gamma}{C^\gamma + C50^\gamma}$$

Ecuación 7. Ecuación matemática de ajuste del modelo Emax sigmoideo. E0 corresponde al flujo sanguíneo renal estimado en condiciones basales, E es el efecto medido como aumento en el flujo sanguíneo renal, Emax el efecto máximo observado, C la concentración de furosemide en mg/L, C50 la concentración a la cual se observa el 50% del efecto máximo observado (E50) y gamma (γ) que define el perfil sigmoideo de la curva concentración-efecto.

En la siguiente tabla se muestran los datos de concentración máxima de furosemide (Cmax) en mg/L reportados en bibliografía para cada una de las administraciones (condición) y el flujo renal en mL/min/100g de órgano simulado y optimizado en PK-Sim® así como el flujo renal predicho por el ajuste de la ecuación matemática utilizando la herramienta Solver de Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).

Condición	Cmax (mg/L)	Flujo renal (mL/min/100g órgano)	Flujo renal predicho (mL/min/100g órgano)
Basal	0.00	648.00	665.56
PIV 8h	0.16	802.88	766.63
PIV 2h	0.62	991.12	1019.35
PIV 30 min	2.22	1500.00	1487.55
IV Bolo	13.6	2005.03	2007.94

Tabla 12. Variación en el flujo sanguíneo renal dependiente de la concentración máxima observada de furosemide en plasma (Cmax) determinada por optimización de parámetros

multivariable y valor predicho para dicha variación del flujo sanguíneo renal por la ecuación Emax del modelo farmacodinámico.

Parámetro	Valor estimado	Unidad
C50	1.86	mg/L
Emax	1501.35	mL/min/100g órgano
Eo	665.56	mL/min/100g órgano
Gamma	1.07	-

Tabla 13. Parámetros estimados del modelo Emax para la variación del flujo sanguíneo renal dependiente de la concentración plasmática de furosemide con su correspondiente unidad de medida.

De acuerdo al valor estimado para el parámetro gamma, la ecuación fue simplificada para ser introducida en MoBi® y posteriormente exportada y aplicada a las simulaciones, asumiendo un valor de gamma correspondiente a la unidad (1.0), sin afectar en forma significativa la suma de residuos cuadrados ni la inspección visual del modelo, quedando determinado de acuerdo a la siguiente ecuación matemática:

$$E = E0 + \frac{Emax * C}{C + C50}$$

Ecuación 8. Ecuación matemática de ajuste del modelo Emax no sigmoideo. E0 corresponde al flujo sanguíneo renal estimado en condiciones basales, E es el efecto medido como aumento en el flujo sanguíneo renal (FSR), Emax el efecto máximo observado, C la concentración de furosemide en mg/L y C50 la concentración a la cual se observa el 50% del efecto máximo observado (E50).

El FSR se estimó ajustando el modelo para cada situación de administración de furosemide y utilizando la optimización de parámetros en el modelo PBPK, cambiando únicamente el flujo renal como variable de ajuste y manteniendo constante la tasa de filtración glomerular. En el siguiente gráfico se muestra la variación del FSR en función de la concentración máxima observada de furosemide en plasma luego de las diferentes

administraciones en mg/L y la función matemática de ajuste a partir del modelo Emax con la ecuación presentada anteriormente:

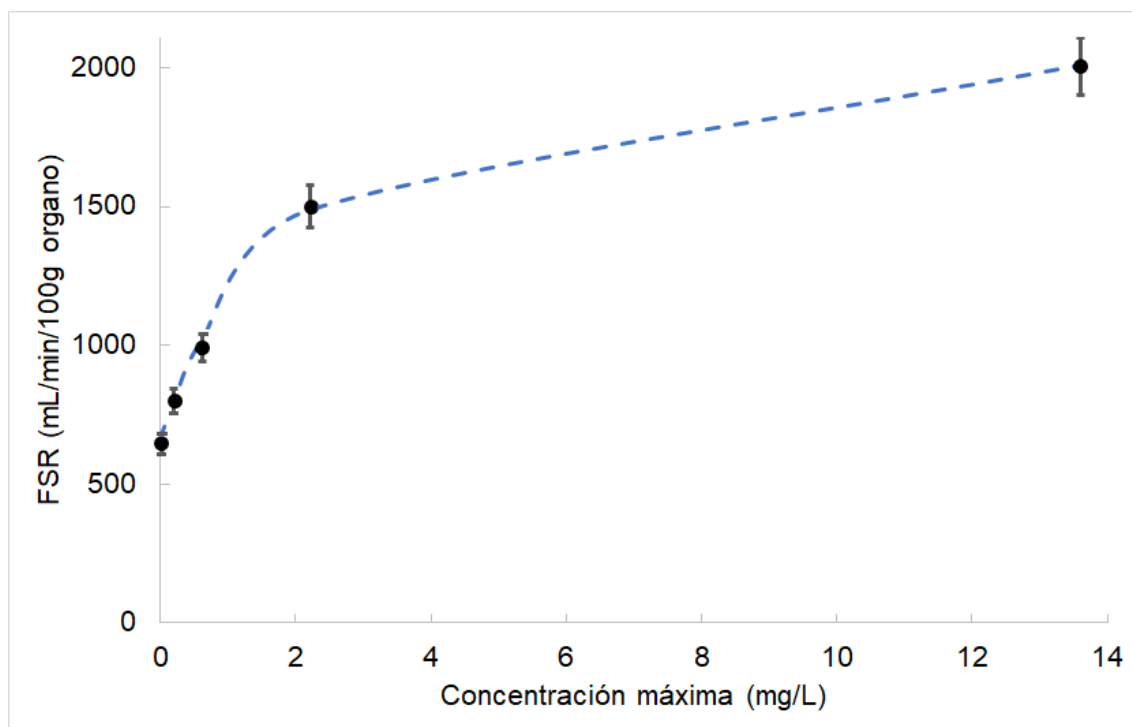


Figura 21. Variación del flujo sanguíneo renal (FSR) en función de la concentración máxima de furosemide en plasma (en mg/L). La función de ajuste se representa con una línea de tendencia en color azul guionada. Los puntos observados se muestran con marcadores circulares negros con su correspondiente desviación estándar en líneas negras con remate superior e inferior.

Por último se incorporó al modelo de variación del flujo sanguíneo renal dependiente de la concentración de furosemide siguiendo un modelo Emax, la presencia de un tiempo de latencia (Tlag) para el inicio del efecto. Dicho ajuste se realizó en MoBi® una vez que se integró la ecuación correspondiente al efecto con los parámetros Emax, E0 y C50. El tiempo de latencia fue optimizado según la velocidad de administración y se encontró una dependencia logarítmica entre ambas variables. La optimización del parámetro fue realizada en primera instancia por inspección visual del gráfico concentración vs. tiempo para cada una de las administraciones y su correspondiente VPC (visual predictive check). En segunda instancia se exportaron los resultados a la herramienta Solver de Microsoft Excel® con la cual se llevó a cabo la minimización de la suma del cuadrado de los residuos a modo de hallar el valor numérico del tiempo de latencia en cada caso. Se resumen dichos resultados en la siguiente tabla:

Administración	Velocidad (mg/h)	Tlag (min)
PIV 8h	2.5	7.7
PIV 2h	10.0	6.0
PIV 30min	40.0	4.2
IV bolo	7200.0	0.8

Tabla 14. Tiempo de latencia optimizado según la velocidad de administración de furosemide en mg/h de acuerdo a las diferentes administraciones analizadas, siendo perfusiones intravenosas (PIV) de 8 horas, 2 horas y 30 minutos, y una administración en bolo (IV bolo) con una duración reportada de 10 segundos.

Con los resultados de la tabla anterior se determinó una ecuación matemática logarítmica que pudiese explicar la variación del tiempo de latencia en el inicio del efecto de la variación del flujo sanguíneo renal inducida por la concentración de furosemide en perros, dependiente de la velocidad de administración del fármaco con una correlación directa a la concentración máxima de furosemide observada en plasma. Si bien dicha ecuación no es introducida directamente en MoBi® dado que el tiempo de latencia se ajusta dentro de la cascada de eventos, la misma permite calcular su valor para otras velocidades de administración (en mg/h).

$$Tlag \text{ (min)} = -0.836 \cdot \ln \left(V.A. \left(\frac{mg}{h} \right) \right) + 7.974$$

$$R^2 = 0.970$$

Ecuación 9. Variación del tiempo de latencia (en minutos) observado en el inicio del efecto de aumento del flujo sanguíneo renal canino inducido por furosemide en función de la velocidad de administración (V.A.) de la perfusión intravenosa en mg/h.

Se verificó además la bondad del ajuste matemático realizando un gráfico de observaciones versus predicciones. En este caso las observaciones corresponden a los tiempos de latencia (Tlag) optimizados e integrados en el modelo farmacocinético. Las

predicciones corresponden a los tiempos de latencia estimados por la ecuación matemática logarítmica en función de las velocidades de administración de interés.

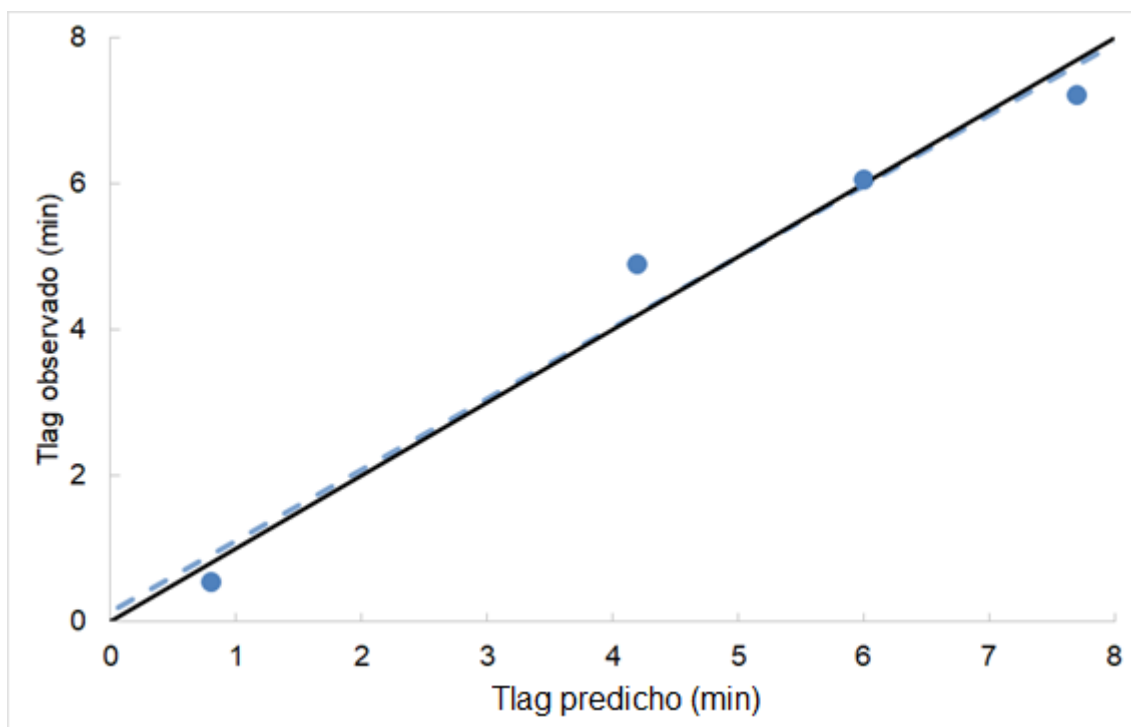


Figura 22. Gráfico de observaciones versus predicciones (OBSvsPRED) para el tiempo de latencia (marcadores en azul) con Tlag predicho por la función matemática ajustada en el eje de las abscisas y Tlag optimizado en el modelo a partir de los datos experimentales bibliográficos en el eje de las ordenadas. La recta punteada en color azul corresponde a la regresión lineal de los puntos del gráfico.

Se optimiza de esta manera el modelo y se realiza finalmente el ajuste con los datos reportados en bibliografía (Lee et al., 1986) para la excreción de furosemide en orina en perros en función del tiempo, habiendo completado el ajuste del metabolismo de furosemide por UGT1A9 y la excreción renal ajustada a la tasa de filtración glomerular, secreción tubular activa siguiendo una cinética de Michaelis-Menten, vasodilatación renal inducida por furosemide con su respectiva modificación del flujo sanguíneo renal específico y el tiempo de latencia asociado a dicha modificación de acuerdo a la velocidad de administración. Se presenta a continuación el gráfico que representa el ajuste del modelo para los datos de furosemide en orina correspondientes a la perfusión intravenosa de 8 horas de 20mg de furosemide:

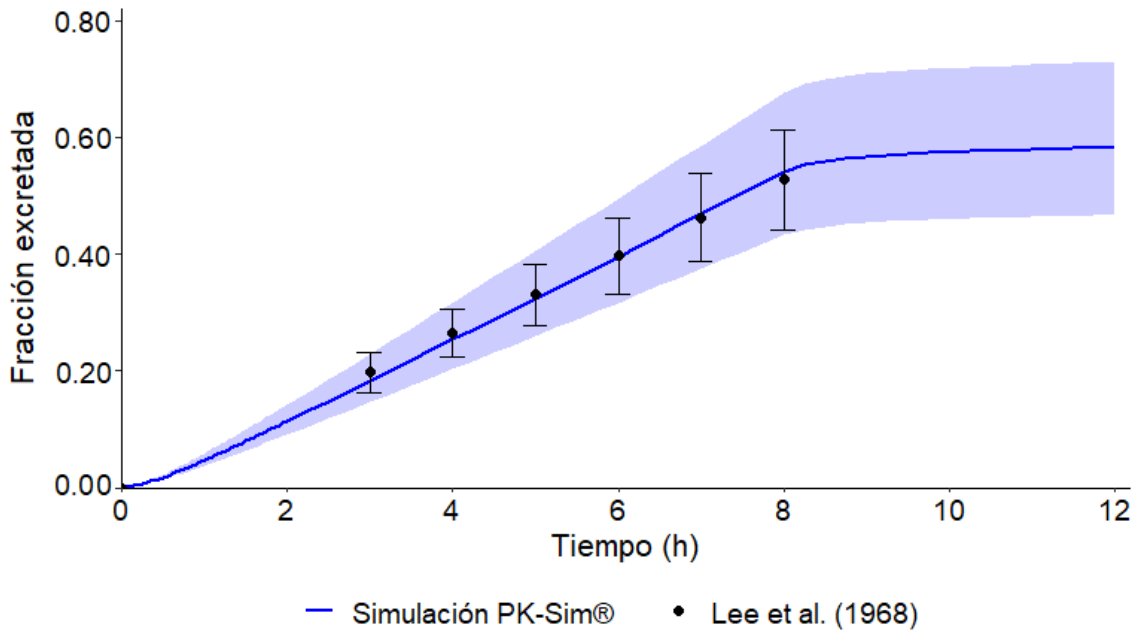


Figura 23. Fracción excretada de furosemide en orina simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 8 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% frente a los datos de bibliografía (marcadores romboides de color negro) con su respectiva desviación estándar (líneas finas verticales de color negro).

De la misma forma a lo realizado para la excreción de furosemide en orina a lo largo del tiempo para la perfusión intravenosa de 8 horas, se verificó el nuevo ajuste del modelo a las perfusiones intravenosas de la bibliografía de 2 horas y 30 minutos de duración para la misma dosis total de furosemide correspondiente a 20mg. Se presentan a continuación dichos resultados en forma gráfica:

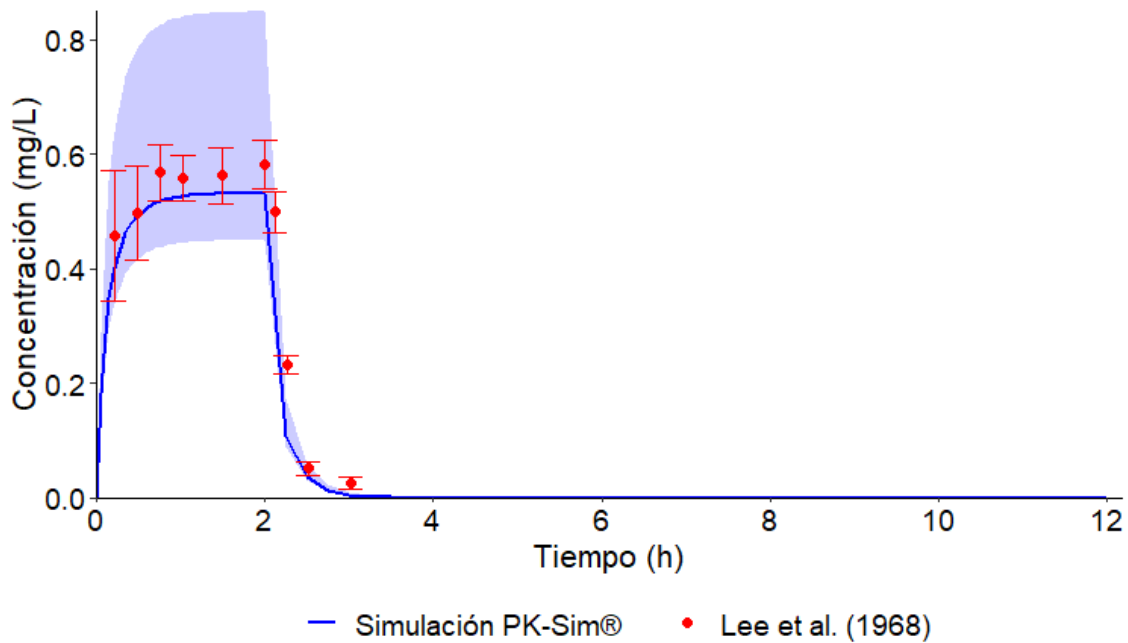


Figura 24. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 2 horas a velocidad constante (línea azul gruesa) con su respectivo 90%CI frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva SD en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

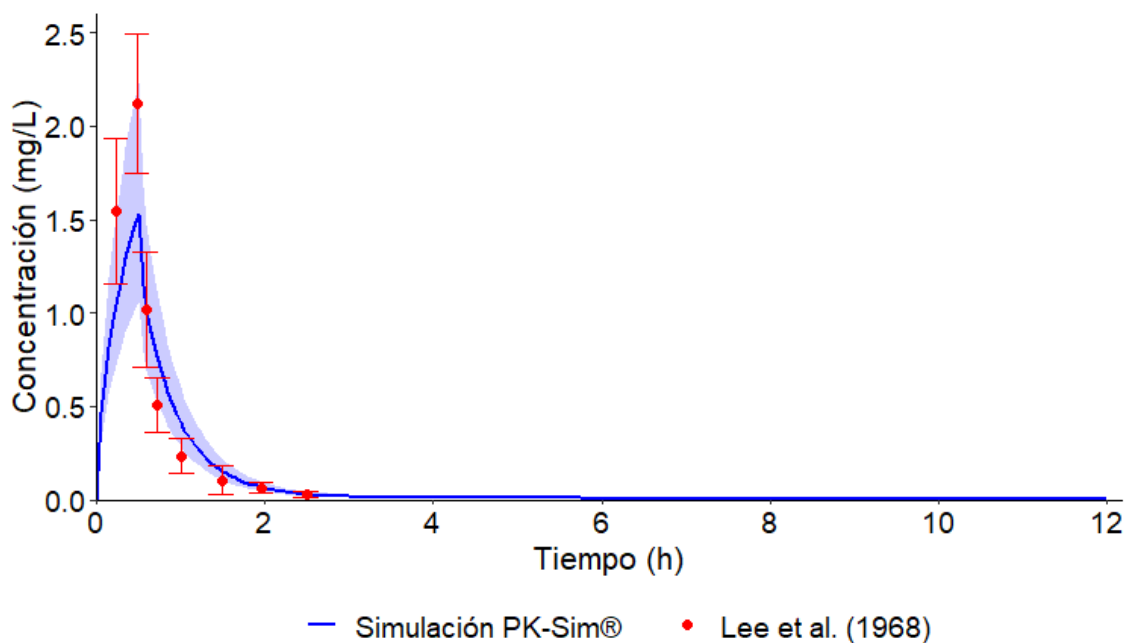


Figura 25. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 7.4kg a 17kg tras una administración de 20mg de furosemide por perfusión intravenosa de 30 minutos a velocidad constante (línea azul gruesa) con

su 90%CI frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva SD en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

Se utilizaron posteriormente datos bibliográficos que representan un perfil farmacocinético poblacional en perros Beagle de pesos corporales entre 10 y 13 Kg (Koh et al., 2021) luego de la administración de comprimidos de furosemide por vía oral a razón de 2mg/kg, con el objetivo de evaluar la fase de absorción del modelo y realizar un ajuste del efecto farmacodinámico de variación de flujo sanguíneo renal de furosemide teniendo en cuenta en este caso una administración por vía oral cuya absorción depende de la existencia de una ventana de absorción para el fármaco estudiado y del tiempo de vaciado gástrico en la especie de interés. Con la evaluación de la fase de absorción incorporando los datos bibliográficos de administración oral con su correspondiente perfil de disolución informado, puede visualizarse en el siguiente gráfico una marcada subestimación de la concentración plasmática máxima observada:

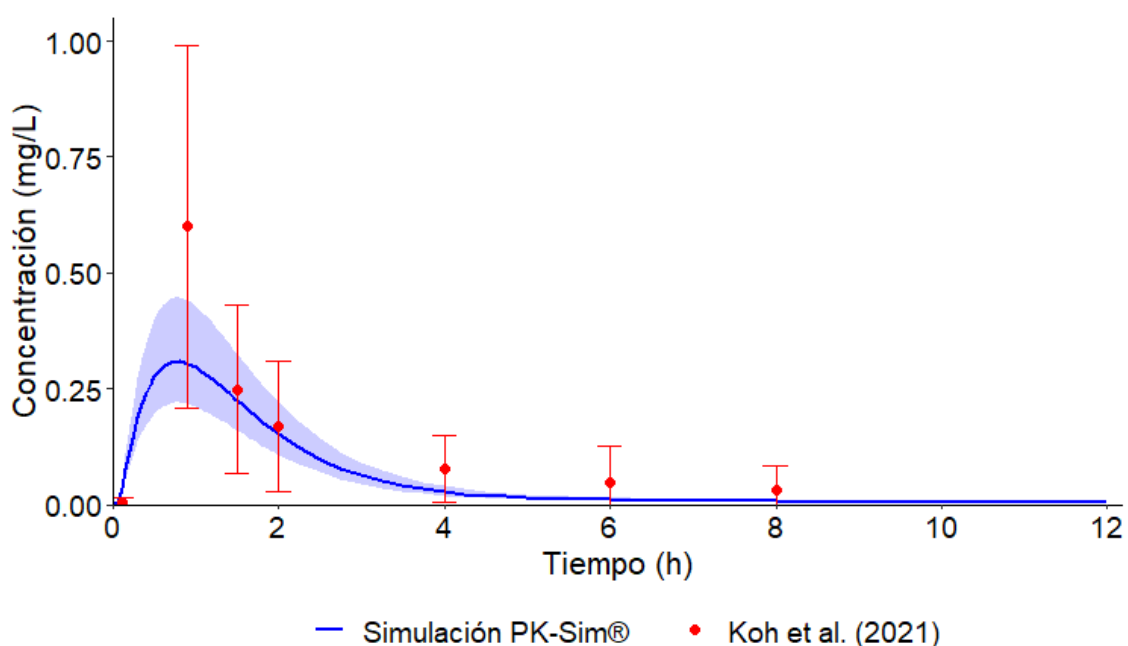


Figura 26. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 10kg a 13kg tras una administración de 2mg/kg de furosemide por vía oral (línea azul gruesa) con su respectivo intervalo de confianza al 90% (líneas finas verticales de color azul con borde superior e inferior) frente a los datos de bibliografía (marcadores rómbicos de color rojo) con su respectiva desviación estándar en mg/L (líneas finas verticales de color rojo).

Si bien dicha concentración máxima presenta una elevada variabilidad, se procede a ajustar el modelo para la fase de absorción realizando un análisis de sensibilidad en función de la concentración máxima y un posterior proceso de optimización de parámetros para las variables de mayor impacto en el ajuste deficiente de la fase de absorción del fármaco luego de administrado el medicamento por vía oral. Los parámetros identificados en el análisis de sensibilidad y ajustados de acuerdo a la bibliografía y un nuevo proceso de optimización paramétrica, son presentados en la siguiente tabla así como también la variación numérica de los mismos respecto a la optimización paramétrica anterior utilizando los datos de concentraciones plasmáticas de perfusiones intravenosas y bolo intravenoso (Lee et al., 1986):

Parámetro	Valor optimizado	Variación	Unidad	% relativo de variación (%)
Tiempo de vaciado gástrico	42.75	7.25	min	14.5
pH gástrico (ayuno)	1.30	0.20	-	13.3
UGT1A9 concentración de referencia	0.82	-0.43	μmol/L	92.0
UGT1A9 Vmax	576.0	-184.0	μmol/L.min	24.0

Tabla 15. Valores fijados en el modelo luego de realizados los análisis de sensibilidad y las optimizaciones de parámetros (parameter optimization) correspondientes utilizando los datos bibliográficos correspondientes a la absorción dada la administración por vía oral de furosemide en perros Beagle sanos de 10 kg a 13 kg (Koh et al., 2021).

Se incorporaron dichos resultados en la simulación correspondiente al modelo de administración oral en Beagle (Koh et al., 2021) y se realizó una simulación predictiva poblacional para n=500 a modo de obtener el siguiente perfil farmacocinético poblacional para los pesos corporales de acuerdo a los perros utilizados en el ensayo:

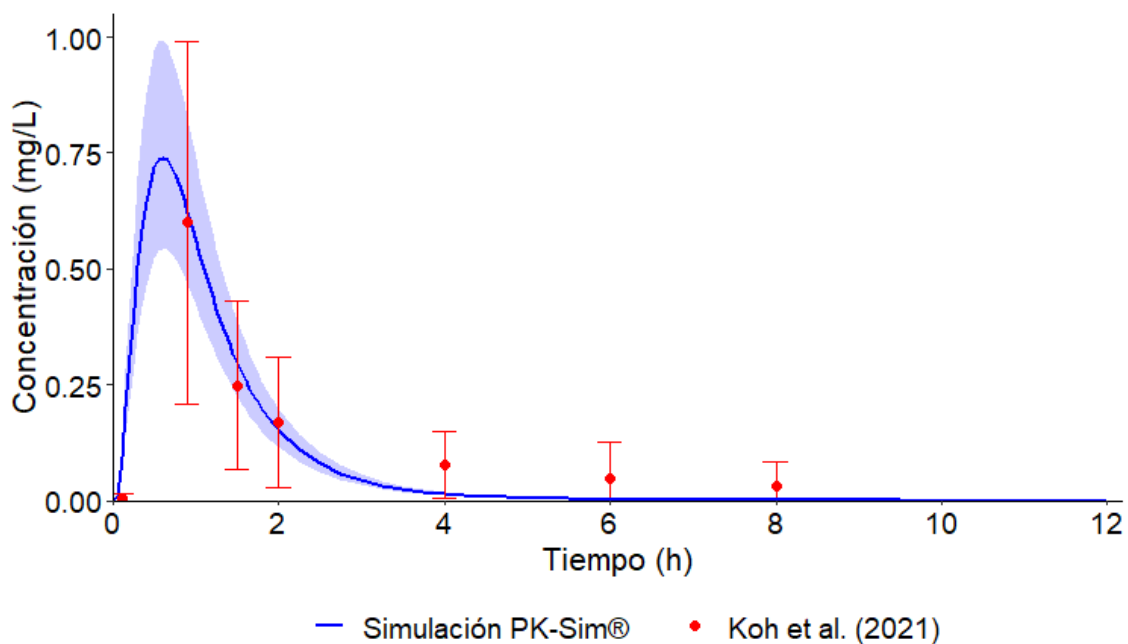


Figura 27. Concentraciones plasmáticas de furosemide en mg/L simuladas de acuerdo al modelo optimizado (según Tabla 15) en absorción oral para una población de perros Beagle n=500 con pesos desde 10 kg a 13 kg tras una administración de 2mg/kg de furosemide con su respectivo 90% CI (color azul) frente a los datos de bibliografía con su SD (color rojo).

ii. Consideraciones del modelo PBPK desarrollado a partir de parámetros fisicoquímicos, biológicos e información bibliográfica de furosemide en perros

Se logró desarrollar un modelo farmacocinético de tipo PBPK utilizando los software PK-Sim® y MoBi® que permitió explicar de forma correcta las determinaciones de concentraciones plasmáticas versus tiempo y cantidad excretada de furosemide en orina versus tiempo extraídos de la bibliografía. Se incluyó una secreción tubular activa de furosemide utilizando la cinética de Michaelis Menten para explicar su excreción renal además del proceso de filtración glomerular. También se adaptó un aumento dependiente de la concentración en el flujo sanguíneo renal en el modelo que afecta la excreción renal de furosemide en perros y es coherente con la venodilatación renal reportada en la bibliografía para la especie. Dicho aumento dependiente de la concentración de furosemide responde a un modelo farmacodinámico establecido en base a una ecuación del tipo Emax (no sigmoidea). La verificación se realizó contra los datos de Lee et al. (1986) de perfusión intravenosa y de Koh et al. (2021) de administración por vía oral.

iii. Integración de información *in vitro* biorrelevante y aplicación del modelo PBPK a las formulaciones en estudio

Se procede a trabajar con las formulaciones en estudio dentro del modelo PBPK desarrollado previamente y por lo tanto se debe crear el medicamento correspondiente con la forma farmacéutica de interés en la categoría “formulación” de PK-Sim® incorporando los datos de los perfiles de disolución adquiridos en el presente trabajo por ensayos de disolución *in vitro* para las dos formulaciones veterinarias de trabajo en los tres medios biorrelevantes seleccionados a pH 1.2, 4.5 y 6.8 para simular el tránsito del fármaco a través del tracto gastrointestinal del animal. Por lo tanto se crean en total seis formulaciones siendo tres formulaciones para cada medicamento de uso veterinario ensayado. Es importante destacar que para la simulación farmacocinética en pequeños animales, como en este caso en perros, son incluidas y consideradas únicamente las formulaciones veterinarias de furosemide disponibles en el mercado farmacéutico-veterinario uruguayo en la actualidad. No son consideradas por tanto las formulaciones para administración oral de furosemide en humanos. En esta instancia las poblaciones caninas deben tener una variabilidad del peso basada en los pesos reales de los perros que participaron del ensayo *in vivo* de furosemide, por lo tanto se crearon poblaciones n=100 y n=1000 con pesos entre 25Kg y 30Kg para realizar los análisis farmacocinéticos de las formulaciones veterinarias del fármaco. Teniendo en cuenta la variabilidad de los pacientes que reciben furosemide como parte de su tratamiento cardiológico en el hospital veterinario y las diferentes razas de las cuales provienen los datos farmacocinéticos de furosemide en plasma *in vivo* para la contrastación del modelo PBPK *in silico*, es apropiado considerar una población creada a partir del individuo genérico “dog” en lugar de únicamente considerar a la raza Beagle como raza canina de experimentación, cuyo peso promedio además es marcadamente inferior al peso promedio de los pacientes utilizados en la presente investigación (presentando pesos corporales entre 25Kg y 30Kg). En los protocolos de administración, se plantea la administración de dos comprimidos de furosemide por vía oral teniendo en cuenta el rango de pesos de los individuos y las dosis usuales utilizadas en la clínica para el manejo de la insuficiencia cardíaca congestiva iniciando los tratamientos con 2.5 a 5mg/kg administrados cada 6 a 8 horas (Schmidt, 1964). En las simulaciones realizadas se trabaja con dosis única. La dosis total corresponde al doble de la dosis declarada de furosemide por comprimido teniendo en cuenta la administración de dos comprimidos por vía oral. Los datos de disolución

biorrelevante *in vitro* del aparato disolutor USP II a los tres pH de trabajo se agregaron a este modelo visualizándose tanto en formato de tabla como en forma gráfica para simular la farmacocinética de furosemide después de una dosis oral única de dos comprimidos de cada marca comercial por individuo, teniendo en cuenta el peso promedio de la población y la dosis total declarada de principio activo a administrar para la posterior cuantificación *in silico* de las concentraciones plasmáticas de furosemide en función del tiempo. La asignación de marcas test y referencia de las formulaciones de uso veterinario fue realizada de acuerdo a la similitud en la performance de disolución a los tres pH de trabajo y en la performance de desintegración respecto a la marca EFA® asignada como referencia anteriormente para los ensayos *in vitro*.

Los perfiles farmacocinéticos obtenidos por simulación son generados a partir de la media geométrica de concentraciones plasmáticas de 1000 individuos con sus correspondientes intervalos de confianza al 90%. En la exploración inicial de los datos en el software se desarrollaron seis simulaciones por población n=1000 de acuerdo a los tres perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8 para cada una de las dos marcas comerciales seleccionadas. Teniendo en cuenta la fisiología del tracto digestivo canino, el carácter ácido-base de furosemide y las concentraciones plasmáticas observadas luego de la administración oral en la simulación, se seleccionaron los perfiles de disolución en aparato USP II a pH 1.2 como perfiles de disolución de las formulaciones veterinarias ingresadas como medicamentos en el programa y en base a éstos se desarrolló la simulación y la contrastación *in silico* final de los datos *in vivo*. Se observa además que utilizando los datos de disolución de las formulaciones en aparato USP II a pH 4.5 se sobreestiman más de un 100% las concentraciones plasmáticas de furosemide en comparación al modelado por vía oral a partir de información bibliográfica (Koh et al., 2021). Por último, cabe destacar que además de no presentar correlato fisiológico, el uso de los perfiles de disolución a pH 6.8 sobreestima más de un 150% las concentraciones plasmáticas de furosemide luego de la administración oral correspondiente.

Se realizó la simulación farmacocinética predictiva con la población virtual de 1000 perros (500 hembras y 500 machos) con pesos corporales restringidos de acuerdo a la población n=6 utilizada en el ensayo *in vivo* que será presentado en el siguiente capítulo y corresponde a un límite inferior de 25 kg y un límite superior de 30 kg. Se

implementaron valores predeterminados de PK-Sim® para la variabilidad entre sujetos para parámetros anatómicos y fisiológicos. Las concentraciones plasmáticas en ug/L simuladas de furosemide luego de la administración por vía oral de las formulaciones test y referencia fueron graficadas por separado expresando la media geométrica con su respectivo intervalo de confianza al 90%. Las concentraciones en función del tiempo fueron simuladas en el software cada 3 minutos durante un período inicial de 2 horas y luego cada 15 minutos hasta 24 horas después de la dosis. Las predicciones fueron realizadas teniendo en cuenta un ayuno de 8 horas en los individuos simulados acorde a lo estipulado en los ensayos *in vivo* realizados. Los parámetros farmacocinéticos medios de interés en bioequivalencia como concentración máxima (Cmax) y el área bajo la curva de concentración-tiempo hasta tiempo infinito (AUC0-inf.) fueron determinados en valor medio y su correspondiente variación para permitir la comparación y contrastación *in vivo-in silico* con los resultados del ensayo de bioequivalencia.

Parámetro	Formulación Test		Formulación Referencia	
	Media	S.D.	Media	S.D.
AUC 0-inf. (µg.min/L)	1116.50	685.95	7121.41	3318.00
Cmax (µg/L)	9.64	1.34	66.18	9.42

Tabla 16. Estimación de los parámetros de bioequivalencia poblacional a partir de los perfiles farmacocinéticos simulados *in silico* tras una dosis única de furosemide por vía oral en ayunas de formulación test y formulación referencia.

Un procedimiento análogo se realizó para el tiempo al cual se observa la concentración máxima de furosemide en plasma (Tmax) luego de la administración por vía oral de la formulación test y la formulación referencia, sin embargo al igual que para el ensayo *in vivo*, se compararon la mediana de Tmax test y la mediana de Tmax referencia, así como los valores máximo y mínimo observados en cada caso:

Tmax (min)	Formulación Test	Formulación Referencia
Mediana	96.0	75.0
Máximo	91.2	75.9
Mínimo	100.8	72.0

Tabla 17. Resultados para Tmax de test y referencia expresados como mediana, valor máximo observado y valor mínimo observado en minutos.

Acorde al ensayo de bioequivalencia virtual, se calcularon y analizaron los cocientes test/referencia para los parámetros AUC0-inf. y Cmax en forma no paramétrica y con la transformación logarítmica correspondiente para ser expresados como media geométrica del cociente e intervalo de confianza al 90% (90% CI) con los valores extraídos desde PK-Sim®. Los resultados son presentados en la siguiente tabla:

Cociente	Media	CI 90%	
		Inf.	Sup.
AUC 0-inf. T/R	0.156	0.102	0.249
Cmax T/R	0.146	0.105	0.202

Tabla 18. Cocientes test/referencia (T/R) para AUC0-inf. y Cmax expresados como media geométrica y su intervalo de confianza al 90% (IC 90%) en extremo inferior (Inf.) y superior (Sup.).

Capítulo 4. Ensayo de bioequivalencia en perros sanos y contrastación *in vivo-in silico* del modelo farmacocinético poblacional.

En el presente capítulo se describe el ensayo de bioequivalencia realizado en seis perros sanos a los cuales se les administró en forma cruzada las dos presentaciones de furosemide disponibles en el mercado uruguayo en forma de comprimidos para administración por vía oral de uso veterinario. Se determinaron métricas farmacocinéticas de interés y los cocientes test/referencia necesarios con el objetivo específico de evaluar la biodisponibilidad relativa obtenida por las formulaciones, así como determinar la posible bioequivalencia entre las mismas de acuerdo a la especificación vigente y el impacto que puede tener la misma en la terapéutica cardiológica canina. Se presentan además los resultados de la contrastación con la predicción obtenida mediante el modelo PBPK desarrollado (presentado en el Capítulo 3) y se discute la capacidad predictiva del modelo así como las limitaciones del mismo.

i. Desarrollo y validación del método analítico para la extracción y cuantificación de furosemide en plasma canino por HPLC-FLD.

Previamente al desarrollo del método se realizó la revisión bibliográfica correspondiente de antecedentes científicos para la determinación del analito de interés por cromatografía líquida de alta presión y cuantificación por espectroscopía de fluorescencia (Gomez G. et al., 2005) o por espectrofotometría ultravioleta (Valizadeh H. et al., 2005). Para la validación de las técnicas de extracción y cuantificación de furosemide en plasma canino se siguieron las guías para la industria de la FDA (U.S. Food and Drug Administration) para la validación de métodos bioanalíticos (FDA, 2018).

El método analítico para la cuantificación de furosemide fue desarrollado por el sistema UHPLC-FLD Dionex Ultimate 3000 Series controlado por el software Chromeleon de Dionex. El proceso de separación se realizó por fase reversa utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm) a 37°C (temperatura del compartimiento de horno) y una fase móvil acetonitrilo:buffer fosfato pH 3.0 en proporción relativa 35:65 v/v a flujo 0.650mL/min durante un tiempo total de corrida de 12 minutos. El volumen de inyección fue 50uL y la temperatura del compartimiento de muestras fue establecida a 10°C. La detección se realizó a través de detector de fluorescencia con longitudes de onda de emisión a 270 nm y excitación a 470 nm, cuantificando a través de la relación de áreas

entre los picos de estándar interno y analito en forma de cociente. Se utilizó imipramina (IMP) como estándar interno, habiendo preparado previamente una solución metanólica de concentración conocida a partir del estándar sólido de dicho compuesto.

De acuerdo a la validación del método, el mismo resultó lineal en un rango de concentraciones plasmáticas de 0.015 $\mu\text{mol/L}$ a 30.300 $\mu\text{mol/L}$. El coeficiente de determinación para la linealidad es superior a 0.99 y la ecuación corresponde a una recta $y=1.0189x$ siendo “y” la concentración de furosemide en las soluciones plasmáticas de calibración y “x” el área relativa FURO/IMP (analito furosemide/estándar interno imipramina). El coeficiente de variación (C.V.) en porcentaje fue menor al 10% en todos los niveles de concentración de analito (ver Anexo II) siendo máximo para la solución plasmática más diluida (de concentración molar 0.015 $\mu\text{mol/L}$) con un valor correspondiente a 6.97%.

Para evaluar la precisión y la exactitud del método se utilizaron tres soluciones de control preparadas a partir de plasma canino blanco fortificado con furosemide a tres concentraciones de referencia (Ref1, Ref2 y Ref3) a aproximadamente el 25%, 50% y 75% del rango de linealidad. El método analítico validado posee adecuados niveles de precisión y exactitud. Para el ensayo de precisión se lograron coeficientes de variación menores al 3.0% siendo 2.86% el valor más alto correspondiente a la solución de referencia de menor concentración (Ref1). Con respecto al ensayo de exactitud, el % de apartamiento no supera el 10% en ninguno de los tres niveles de concentración ensayados. En el Anexo II se presentan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud en forma detallada.

Se realizó el ensayo de recuperación de furosemide utilizando las soluciones metanólicas de referencia (Ref1, Ref2 y Ref3) en los tres niveles de concentración anteriormente citados. Las muestras se prepararon a partir de plasma canino blanco fortificado con el analito de acuerdo a las concentraciones establecidas. Tanto las soluciones de referencia como las muestras se inyectaron por triplicado para cada concentración de trabajo y se calculó posteriormente el área promedio. El porcentaje de recuperación fue calculado a partir de las áreas promedio con resultados de recuperación mayor al 80% para todas las concentraciones ensayadas. Los resultados detallados del ensayo de recuperación se presentan en el Anexo II.

ii. Diseño y resultados del ensayo de bioequivalencia en perros sanos

Se realizó un estudio farmacocinético en seis perros sanos con un diseño de tipo ensayo de bioequivalencia cruzado y compensado utilizando las dos presentaciones veterinarias de furosemide disponibles en el mercado uruguayo (test y referencia) en forma de comprimidos para vía oral. Los perfiles de concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo fueron analizados para poder evaluar diferencias entre la biodisponibilidad alcanzada por las formulaciones de furosemide de uso veterinario utilizadas y comercializadas en plaza en nuestro país, y además como herramienta probatoria para poder contrastar el modelo computacional desarrollado para furosemide en perros. El protocolo de experimentación animal fue realizado de acuerdo al protocolo aprobado número 1174 de la CEUA (Comisión de Ética en el Uso de Animales) utilizando perros de la Unidad Táctica K9 de la Guardia Republicana (ver Anexo IV). Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Farmacología de la Unidad de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República).

Del total de perros utilizados, cuatro fueron de raza Pastor Belga Malinois y dos de raza Ovejero Alemán. El peso corporal de los perros raza Belga Malinois varió entre 24 Kg y 27 Kg, mientras que para los perros de la raza Ovejero Alemán el peso corporal fue de 30 Kg en ambos casos. Con respecto al sexo, tres de los perros ensayados eran hembras y tres eran machos. A cada individuo se le administró dos comprimidos de cada una de las marcas comerciales en cada uno de los períodos, los cuales fueron separados por un tiempo de lavado (wash-out) de 7 días. El diseño comprendió: individuos sanos, en ayuno de 8 horas, dosis única, dos períodos, dos tratamientos (según marca comercial), determinación del fármaco en plasma y determinación por HPLC-FLD. Se realizó el muestreo de sangre en las venas del miembro torácico de forma alternada desde el tiempo inicial de administración hasta aproximadamente las 5 horas (300 minutos) de ensayo, el muestreo completo se detalla en el Anexo IV. Se realizó la administración del fármaco furosemide por vía oral en la forma farmacéutica de comprimidos de liberación inmediata y en dosis única para cada formulación. Las dosis administradas corresponden a dos comprimidos de cada una de las formulaciones sin roturas ni fraccionamientos. Se tuvo en cuenta además que los perros utilizados en el ensayo no estuviesen en tratamiento con furosemide ni con ningún otro fármaco, en función de lo cual se seleccionó la muestra de seis perros a ensayar. A los seis perros que participaron del ensayo se les realizó un ayuno de 8 horas previo a la administración de los comprimidos por vía oral en ambos períodos

de ensayo. La asignación de marcas test y referencia de las formulaciones de uso veterinario fue realizada de acuerdo a la similitud en la performance de disolución a los tres pH de trabajo y en la performance de desintegración respecto a la marca EFA® asignada como referencia en el Capítulo 2.

Se determinaron los perfiles farmacocinéticos medios y se grafica así la concentración plasmática media en función del tiempo para cada uno de los tratamientos utilizados. Las concentraciones por debajo del límite de cuantificación fueron utilizadas en el cálculo de la constante beta ($1/h$) en la curva $\ln(C)$ vs. tiempo.

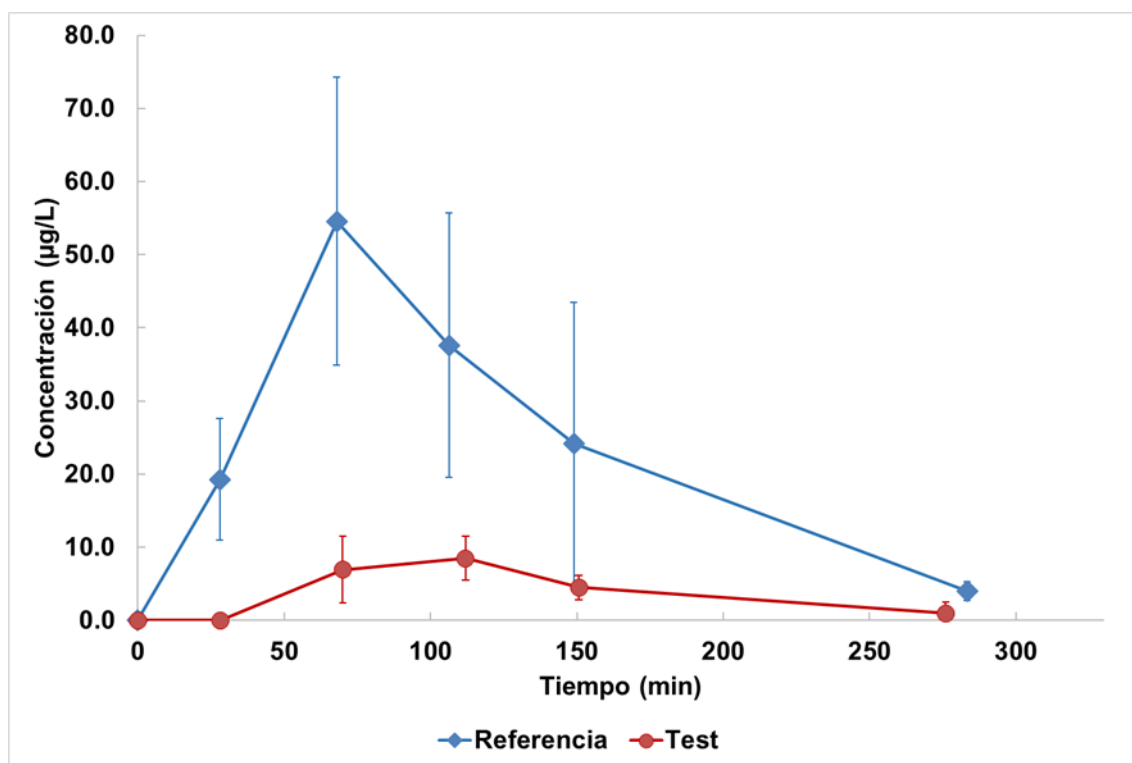


Figura 28. Perfiles farmacocinéticos medios correspondientes al ensayo de bioequivalencia para ambas marcas comerciales.

Con los valores de concentración-tiempo para cada uno de los individuos (pueden visualizarse en Anexo IV) se realizó la transformación logarítmica correspondiente para el cálculo de los valores medios expresados como media geométrica de las métricas: área bajo la curva entre los tiempos de inicio y finalización del ensayo (AUC_{0-T}), constante de eliminación beta (λ), área bajo la curva de cero a infinito ($AUC_{0-inf.}$) y concentración máxima (C_{max}). El área bajo la curva de concentraciones plasmáticas se determinó por el método de trapecios y la constante de eliminación beta por regresión lineal de la curva

Ln(C) en función del tiempo utilizando los últimos dos tiempos de muestreo (ver Anexo IV). La concentración máxima fue determinada en $\mu\text{g/L}$ y las áreas bajo la curva en $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$. Se presentan a continuación dichos resultados para las formulaciones ensayadas:

Métricas	Test		Referencia	
	Media	S.D.	Media	S.D.
AUC 0-T ($\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$)	1102.62	246.76	6205.08	3424.72
β (1/h)	0.46	0.16	0.63	0.27
AUC 0-inf. ($\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$)	1240.64	496.26	6684.19	3379.25
Cmax ($\mu\text{g/L}$)	10.18	2.41	54.59	19.73

Tabla 19. Resultados medios y desviación estándar de los parámetros área bajo la curva entre los tiempos de inicio y finalización del ensayo (AUC0-T), constante de eliminación beta (β), área bajo la curva de cero a infinito (AUC0-inf.) y concentración máxima (Cmax).

Para el cálculo de Tmax (tiempo al cual se observa la concentración máxima) se determinó la mediana con el conjunto de valores así como también el valor máximo observado y el valor mínimo observado para las formulaciones test y referencia:

Tmax (min)	Test	Referencia
Mediana	93.5	68.5
Máximo	117.0	72.0
Mínimo	70.0	67.0

Tabla 20. Resultados para Tmax de test y referencia expresados como mediana, valor máximo observado y valor mínimo observado en minutos.

Las métricas AUC0-T, AUC0-inf. y Cmax fueron corregidos por la dosis administrada para permitir una comparación cuantitativa precisa entre producto test y producto referencia, así como también fueron corregidos por el peso corporal (Pc) en kg de cada individuo:

Métricas	Test		Referencia	
	Media	S.D.	Media	S.D.
AUC 0-T / D (x10⁻³ min/L)	11.02	2.60	77.56	42.80
AUC 0-inf. / D (x10⁻³ min/L)	12.40	5.59	83.55	42.24
Cmax / D (x10⁻³ 1/L)	0.10	0.02	0.63	0.25
AUC 0-T / (D. Pc) (x10⁻⁵ min/L .Kg)	42.22	11.66	330.28	174.57
AUC 0-inf. / (D. Pc) (x10⁻⁵ min/L. Kg)	49.62	22.18	349.17	174.08
Cmax / (D. Pc) (x10⁻⁵ 1/L. Kg)	0.39	0.11	2.59	1.06

Tabla 21. Resultados de los parámetros AUC0-T, AUC0-inf. y Cmax corregidos por la dosis administrada (D) y por el peso corporal (Pc) para productos test y referencia.

Acorde al ensayo de bioequivalencia, se calcularon y analizaron los cocientes test/referencia para los parámetros AUC0-inf. y Cmax en forma con la transformación logarítmica correspondiente para ser expresados como media geométrica del cociente e intervalo de confianza al 90% (90%CI) determinado por ANOVA (análisis de varianza) en el cual se tuvieron en cuenta como fuentes de variación a los sujetos, los tratamientos (test y referencia) y los períodos correspondientes a cada uno de ellos (período 1 y período 2). La varianza residual del ANOVA se utilizó para el cálculo del intervalo de confianza al 90% T/R y para verificar el correcto diseño del ensayo (Fagiolino et al., 2010). Los resultados son presentados en la siguiente tabla:

Cociente	Media	IC 90%	
		Inf.	Sup.
AUC 0-inf. T/R	0.148	0.106	0.208
Cmax T/R	0.163	0.103	0.256

Tabla 22. Cocientes test/referencia (T/R) para AUC_{0-inf.} y C_{max} expresados como media geométrica y su intervalo de confianza al 90% (IC 90%) en extremo inferior (Inf.) y superior (Sup.).

iii. Evaluación de la capacidad predictiva del modelado biofarmacéutico basado en fisiología aplicado a la bioequivalencia virtual.

Se presentan a continuación en forma gráfica los resultados de la contrastación del modelo farmacocinético que permite observar la predicción de concentraciones plasmáticas en función del tiempo para una población virtual de 1000 perros versus los resultados de los perfiles farmacocinéticos medios del estudio de bioequivalencia realizado:

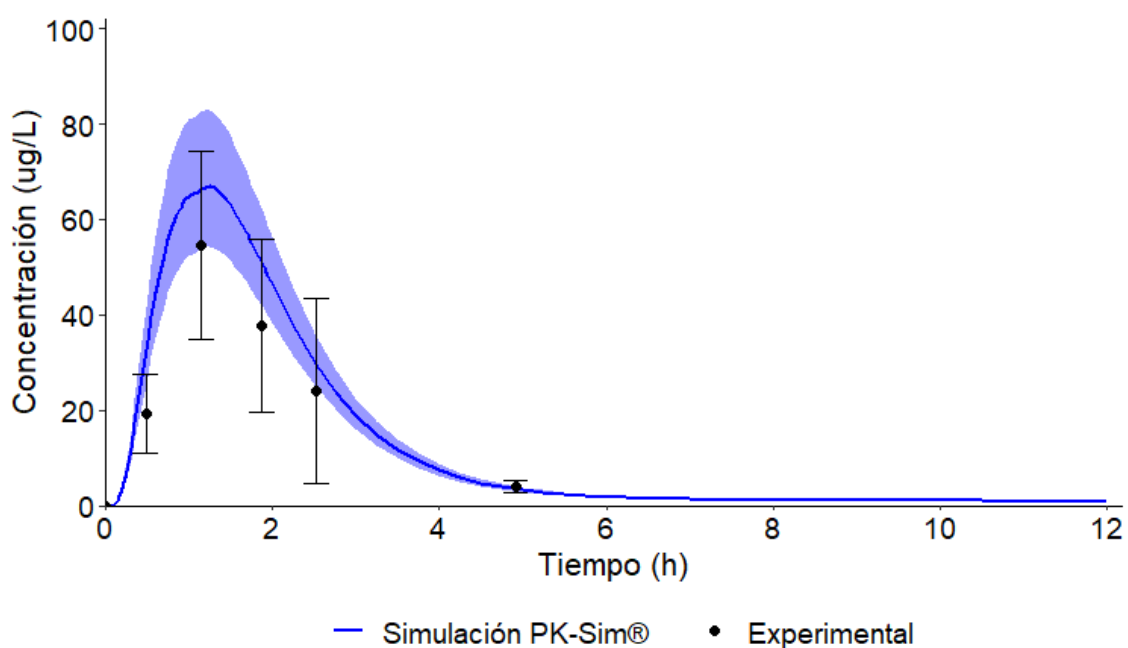


Figura 29. Perfiles farmacocinéticos simulados (concentración en ug/L en función del tiempo en horas) para población n=1000 luego de la administración de dos comprimidos por vía oral de la formulación veterinaria Referencia. El gráfico corresponde a la media aritmética de concentraciones plasmáticas venosas (línea gruesa en color rojo) con su respectivo 90%CI. La contrastación con los datos observados *in vivo* puede observarse con los datos expresados en su valor medio (puntos en color negro) y su respectiva desviación estándar (líneas finas en color negro con terminación en punta invertida).

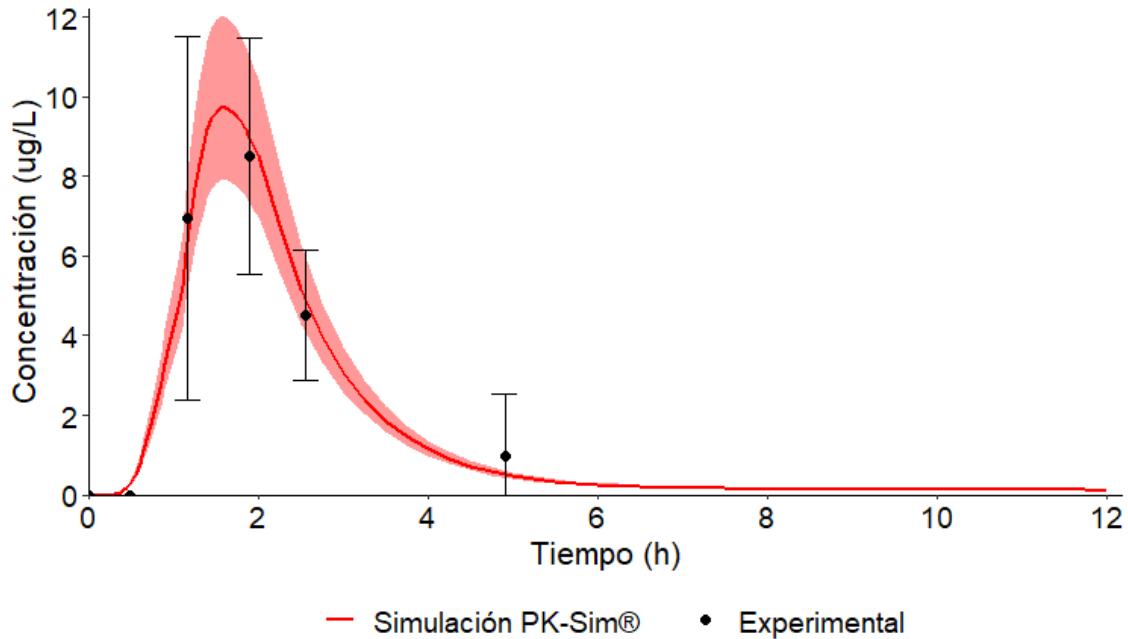


Figura 30. Perfiles farmacocinéticos simulados (concentración en ug/L en función del tiempo en horas) para población n=100 luego de la administración de dos comprimidos por vía oral de la formulación veterinaria Test. El gráfico corresponde a la media aritmética de concentraciones plasmáticas venosas (línea gruesa en color azul) con su 90%CI. La contrastación con los datos observados *in vivo* puede observarse con los datos expresados en su valor medio (puntos en color negro) y su respectiva desviación estándar (líneas finas en color negro con terminación en punta invertida).

Se presentan además los resultados resumidos en forma comparativa en la siguiente tabla para las métricas AUC_{0-inf.} y C_{max} determinadas *in silico* e *in vivo* así como también sus respectivos cocientes T/R y el sesgo o error relativo (ER) en porcentaje (%) correspondiente:

Métricas y cocientes	<i>In silico</i>	<i>In vivo</i>	ER (%)
AUC0-inf. Test ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$)	1116.50	1240.64	11.12
AUC0-inf. Ref. ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$)	7121.41	6684.19	6.14
Cmax Test ($\mu\text{g}/\text{L}$)	9.64	10.18	5.60
Cmax Ref. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	66.18	54.59	17.51
T/R AUC0-inf.	0.156	0.148	5.13
T/R Cmax	0.146	0.163	11.64

Tabla 23. Resultados de la evaluación *in silico-in vivo* del modelo para las métricas AUC0-inf. y Cmax y sus respectivos cocientes T/R. Se informa el error relativo (ER) en forma porcentual (%).

iv. Discusión y análisis de resultados

El método analítico validado para la extracción de furosemide y cuantificación por HPLC-FLD cumplió con las normas y criterios de la FDA para validación de métodos bioanalíticos y fue apropiado en rango, precisión y exactitud para la determinación de la concentración de furosemide en plasma canino en los ensayos *in vivo* realizados con administración de ambas formulaciones para uso veterinario. El porcentaje de recuperación no tiene especificación en valor numérico pero los valores obtenidos en la validación se consideran muy apropiados para los tres niveles de concentración ensayados. De acuerdo a los límites de cuantificación y de detección del método validado, podemos afirmar que el mismo es aplicable para medir las concentraciones plasmáticas de furosemide reportadas en bibliografía para perros (Koh et al., 2021; Lee et al., 1986; Verbeek et al., 1981).

Se observaron diferencias significativas en los perfiles medios de furosemide obtenidos a partir del ensayo de bioequivalencia entre la formulación test y la formulación

referencia. Se pudo realizar un análisis rápido por inspección visual de los perfiles farmacocinéticos medios en forma gráfica con su respectiva desviación estándar también graficada, para observar un amplio margen de diferencia entre las concentraciones alcanzadas luego de la administración de las dos formulaciones. Los resultados de los cocientes test/referencia para AUC_{0-inf.} y C_{max} con su 90% CI presentados en el capítulo permiten afirmar que los productos test y referencia son significativamente diferentes para ambas métricas, dichas formulaciones no son bioequivalentes y por lo tanto no son intercambiables en la terapéutica cardiológica sin un ajuste posológico adecuado. El número total de animales utilizados en el ensayo no hizo posible el análisis de covariables como ser la raza o el sexo, siendo la limitación más importante del ensayo.

De acuerdo a los cocientes test/referencia y sus respectivos intervalos de confianza al 90% es importante destacar que las formulaciones no son bioequivalentes y su intercambiabilidad terapéutica no es apropiada. La marcada diferencia en las concentraciones plasmáticas máximas de fármaco así como la exposición total al mismo en los pacientes cardiológicos puede tener impactos significativos en la terapéutica canina y por lo tanto sería adecuado realizar un ajuste posológico apropiado en el caso de realizar el cambio del medicamento test al medicamento referencia y viceversa. Cabe destacar que la concentración máxima es crítica en el mecanismo de acción de furosemide dado que en función de la misma el fármaco administrado tendrá mayor o menor impacto en la variación del flujo sanguíneo renal y por supuesto en el efecto diurético del mismo.

Capítulo 5. Consideraciones finales

A través del presente trabajo de investigación se logró desarrollar un modelo farmacocinético del tipo PBPK para furosemide en perros que permite predecir de manera precisa y veraz las concentraciones plasmáticas del fármaco en función del tiempo para administraciones por vía intravenosa y por vía oral. Una vez ajustado el modelo, permitió predecir la biodisponibilidad relativa entre dos medicamentos consistentes en comprimidos de liberación inmediata, los cuales habían mostrado importantes diferencias en el perfil de disolución y en la desintegración *in vitro*. Las simulaciones *a priori* se realizaron para las formulaciones test y referencia con un diseño experimental correspondiente a un ensayo de bioequivalencia cruzado y compensado, con 2 períodos y 2 secuencias, en una población virtual de 1000 individuos (n=1000). El resultado de dichas simulaciones fue confirmado con muy buena exactitud y precisión en un ensayo de bioequivalencia llevado adelante en 6 perros sanos.

El área bajo la curva de cero a infinito (AUC_{0-inf}) y la concentración máxima de fármaco (C_{max}) fueron predichas con un sesgo relativo inferior al 20% para ambas formulaciones. El cociente test/referencia predicho en la simulación en perros (n=1000) fue de 0.156 para AUC_{0-inf} (90 % CI 0.102-0.249) y 0.146 para C_{max} (90 % CI 0.105-0.202), mientras que los resultados observados en el ensayo *in vivo* fueron 0.148 para AUC_{0-inf} (CI 90% 0.106-0.208) y 0.163 para C_{max} (CI 90% 0.103-0.256). El enfoque PBBM (*Physiologically-Based Biopharmaceutics Modeling*) realizado en PK-Sim® y MoBi® predijo adecuadamente la farmacocinética de furosemide y el rendimiento relativo entre los productos veterinarios en perros.

Cabe destacar que el modelo predice una variabilidad marcadamente inferior que los perfiles determinados experimentalmente. Esto puede explicarse de acuerdo a dos fenómenos en el software que no son excluyentes uno del otro. En primer lugar el modelado PBPK en este caso no tiene en cuenta las diferencias significativas entre razas ni las características fisiológicas de cada raza en particular, sino que trabaja con un perro genérico para crear las poblaciones virtuales de individuos como se explicó anteriormente. En segundo lugar, la base de datos genética y enzimática es desarrollada a partir de parámetros fisiológicos de expresión enzimática y características biológicas generales de perros Beagle de experimentación, que si bien en todos los casos nos

referimos a la especie canina, para los perros utilizados en el ensayo *in vivo* realizado (razas Pastor Belga Malinois y Ovejero Alemán) no se tienen cuenta las características de expresión genética y enzimática propias de cada raza.

El modelo PBPK desarrollado puede utilizarse en el futuro de acuerdo a las siguientes aplicaciones:

- Evaluación de otros productos de liberación inmediata conteniendo furosemide que estén en el mercado farmacéutico y se pretendan utilizar en caninos. Implicaría evaluar dichos productos bajo las condiciones *in vitro* detalladas e integrar los resultados de disolución en el modelo. Debe destacarse que el modelo validado en esta tesis se hizo incorporando formulaciones con rendimientos muy dispares respecto a la disolución *in vitro*. De esta forma, es altamente probable que el modelo PBPK logre adecuadas predicciones farmacocinéticas para formulaciones que presenten un perfil de disolución más rápido que el producto test o más lento que el producto de referencia. Esto le da al modelo una alta capacidad en cuanto puede ser aplicable en un dominio amplio de velocidades de disolución. La aplicación puede ser de interés para la autoridad reguladora y para laboratorios farmacéuticos, en tanto que brinda una manera de evaluar la calidad biofarmacéutica sin la necesidad de realizar ensayos clínicos. Por supuesto existe también un componente ético favorable.
- Desarrollo de productos bioequivalentes respecto a la formulación Referencia. El modelo puede ser utilizado en el proceso de desarrollo de una nueva formulación integrando información *in vitro* obtenida para diferentes formulaciones candidatas, haciendo dicho proceso más eficiente.

Asimismo, el modelo podría ser ampliado a un modelo PBPK/PD, en donde se incluya una relación entre la exposición a furosemide y el efecto provocado. Esta herramienta, la cual debería ser validada en nuevos ensayos clínicos, podría ser muy útil para apoyar el desarrollo de formulaciones innovadoras, que logren maximizar el perfil de exposición para obtener la máxima capacidad de diuresis con la menor cantidad de administraciones diarias posibles. Tratándose de un principio activo de semivida corta, como lo es furosemide, este tipo de formulaciones sería muy ventajosa. Sin embargo debe destacarse

que dada la ventana de absorción que muestra el principio activo, productos de liberación prolongada han resultado tener una menor biodisponibilidad. Por lo tanto está vigente la oportunidad para desarrollar formulaciones de liberación modificada que aprovechen la ventana de absorción y optimicen el perfil de liberación en función de conseguir eficacia por más tiempo, por ejemplo sistemas flotantes que permanezcan en el estómago liberando lentamente el principio activo.

En síntesis, se abordó adecuadamente el estudio farmacocinético de las formulaciones de furosemide de uso veterinario disponibles en plaza y se desarrolló un método alternativo al ensayo clínico que puede realizar predicciones con un adecuado nivel de confianza y requerimientos marcadamente inferiores de infraestructura y recursos de investigación. El modelado biofarmacéutico basado en fisiología (PBBM) ha demostrado en esta investigación ser una herramienta efectiva que puede ser utilizada por laboratorios de la industria farmacéutica y por los organismos estatales encargados de la regulación farmacéutica de productos veterinarios.

Referencias bibliográficas

A. C. Andersen. (1970). The beagle as an experimental dog. Iowa State University Press. University of Michigan.

Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition (2006). Nutrient requirements of dogs and cats ([Rev. ed.]). National Academies Press.

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res. 12(3):413-20.

Al-Tabakha, M. M., & Alomar, M. J. (2020). In Vitro Dissolution and in Silico Modeling Shortcuts in Bioequivalence Testing. Pharmaceutics, 12(1), 45.

Benavides, C., Chaves, C., Astaíza, J., Moncayo, A., Vargas, P. (2014). Enfermedad valvular degenerativa canina: reporte de caso. Rev Med Vet. 2014;(28): 91-102.

Bikdeli B, Strait KM, Dharmarajan K, et al. (2013). Dominance of furosemide for loop diuretic therapy in heart failure. Time to revisit the alternatives. J Am Coll Cardiol; 61(14):1549-1550.

Britz H, Hanke N, Taub ME, Wang T, Prasad B, Fernandez É, Stopfer P, Nock V, Lehr T. (2020). Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Probenecid and Furosemide to Predict Transporter Mediated Drug-Drug Interactions. Pharm Res. 25; 37(12):250

Boer, Douwe & Gallardo, Eugenia & Barroso, Mário & Vieira, Duarte. (2005). Determination of furosemide in whole blood using SPE and GC-EI-MS. Journal of analytical toxicology, 29, 309-13.

Borgarelli, M., Crosara, S., Lamb, K., Savarino, P., La Rosa, G., Tarducci, A., Haggstrom, J. (2012) Survival Characteristics and Prognostic Variables of Dogs with

Preclinical Chronic Degenerative Mitral Valve Disease Attributable to Myxomatous Degeneration. *Journal of Veterinary Internal Medicine* (26), 69–75.

Bourreau, J., Hernot, D., Bailhache, E., Weber, M., Ferchaud, V., Biourge, V., Nguyen, P. (2004). Gastric Emptying Rate Is Inversely Related to Body Weight in Dog Breeds of Different Sizes. *The Journal of Nutrition*, 134(8).

Brunton Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L. (2006) Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Undécima Edición. McGraw Hill.

Castro, P., Pérez, O., Greig, D., Díaz Araya, G., Moraga, F., Chiong Lay, M., Troncoso Cotal, R., Padilla, I., Vukasovic Ramírez, J., Corbalán, R. y Lavandero González, S. (2004). Efectos del carvedilol en la capacidad funcional, función ventricular izquierda, catecolaminas y estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

Chapa, R., Li, C. Y., Basit, A., Thakur, A., Ladumor, M. K., Sharma, S., Prasad, B. (2020). Contribution of Uptake and Efflux Transporters to Oral Pharmacokinetics of Furosemide. *ACS Omega*, 5(51), 32939–32950.

Cohen MR, Hinsch E, Vergona R, Ryan J, Kolis SJ, Schwartz MA. (1976). A comparative diuretic and tissue distribution study of bumetanide and furosemide in the dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 197(3):697-702.

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use/European Medicines Agency (2021). Guideline for the Conduct of Bioequivalence Studies for Veterinary Medicinal Products.

Council of Europe. (2020). European pharmacopoeia (Ph. Eur.). Strasbourg: Council of Europe.

Cristofolletti, R., Patel, N., Dressman, J.B. (2017). Assessment of bioequivalence of weak base formulations under various dosing conditions using physiologically based

pharmacokinetic simulations in virtual populations. Case examples: ketoconazole and posaconazole. *J. Pharm. Sci.* 106 (2), 560–569.

Dallmann, A., Solodenko, J., Ince, I., & Eissing, T. (2018). Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Extend an Open Systems Pharmacology Model to the Special Population of Pregnant Women. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 7(7), 419–431.

Dash S., Murthy PN., Nath L., Chowdhury P. (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* May-Jun;67(3):217-23.

Decreto del Poder Ejecutivo N° 12/007 (Ministerio de Salud Pública de Uruguay), de fecha 12 de enero de 2007. Recomendaciones técnicas para la realización de estudios de bioequivalencia: Intercambiabilidad de medicamentos.

Devarakonda B, Otto DP, Judefeind AA, Hill RA, de Villiers MM. (2007). Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int J Pharmaceut.*, 345(1–2), 142–53.

Doki, K., Darwich, A. S., Patel, N., Rostami-Hodjegan, A. (2017). Virtual bioequivalence for achlorhydric subjects: The use of PBPK modelling to assess the formulation-dependent effect of achlorhydria. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 111–120.

Durinck S., Spellman P., Birney E., Huber W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4, 1184–1191.

Eckernäs, E., & Tannergren, C. (2021). Physiologically Based Biopharmaceutics Modeling of Regional and Colon Absorption in Dogs. *Molecular Pharmaceutics*, 18(4), 1699–1710.

Fagiolino P., Vázquez M., Ibarra M. (2010). Biodisponibilidad y bioequivalencia de medicamentos. Tópicos de actualización en Neurología. Guadalajara: Universidad de Guadalajara, 1(3).

Fonseca, J. C. & Garzón López, P. (2017). Efecto de la fuerza de compresión sobre los atributos críticos de calidad en tabletas de liberación inmediata de furosemida. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 46(2).

Food and Drug Administration (2018). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.

Flanagan, S., Cummins, C., Susanto, M., Liu, X., Takahashi, L. H., Benet, L. (2002). Comparison of Furosemide and Vinblastine Secretion from Cell Lines Overexpressing Multidrug Resistance Protein (P-Glycoprotein) and Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP1 and MRP2). *Pharmacology*, 64(3), 126–134.

Flanagan, S. D., Takahashi, L. H., Liu, X., & Benet, L. Z. (2002). Contributions of Saturable Active Secretion, Passive Transcellular, and Paracellular Diffusion to the Overall Transport of Furosemide Across Adenocarcinoma (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(4), 1169–1177.

Florio L., Alvarez P., Galvez-Olotegui T. (2018). Rol cardioprotector del carvedilol para pacientes en quimioterapia, revisión sistemática y metanálisis de estudios clínicos aleatorizados. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 48-58.

Gomez C., Von Plessing C., Godoy M., Reinbach R. (2005). Method validation for the determination of furosemide in plasma by liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 50(2), 479-482.

González Alarcón, Y. (2017). Diseño y elaboración de formulación del producto Ceftibuteno 400 mg cápsula dura de gelatina, validación de las técnicas analíticas y estudio de pre-estabilidad.

Hirai J., Miyazaki H., Taneike T. (1992). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide in the anaesthetized dog. *J Vet Pharmacol Ther.* 15(3):231-9.

Hori, Y., Katou, A., Tsubaki, M., Kanai, K., Nakao, R., Hoshi, F., Higuchi, S. (2008). Assessment of diuretic effects and changes in plasma aldosterone concentration following oral administration of a single dose of furosemide or azosemide in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 69(12), 1664–1669.

Ibarra M., Costa T. D., Schaiquevich P., Cristofolletti R., González I. H., Fajardo-Robledo N. S., Romero-Tejeda E. M. (2019). Iberoamerican Pharmacometrics Network Congress 2018 Report: fostering M&S approaches for drug development, regulatory and clinical applications in Latin America. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*.

Ibarra M, Valiante C, Sopeña P, Schiavo A, Lorier M, Vázquez M, Fagiolino P. (2018). Integration of in vitro biorelevant dissolution and in silico PBPK model of carvedilol to predict bioequivalence of oral drug products. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Jun 15; 118:176-182.

Ibarra M, Vázquez M, Fagiolino P. (2020). Current PBPK Models: Are They Predicting Tissue Drug Concentration Correctly? *Drugs R D.* 20(4):295-299.

Ibarra, M., Schiavo, A., Lesko, L.J. (2021). Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling: Model Development and Evaluation. In: *The ADME Encyclopedia*. Springer, Cham.

Kasprzyk, A. (2011). BioMart: driving a paradigm change in biological data management. *Database*, Vol. 2011(0), bar049.

Kawai, R., Lemaire, M., Steimer, J.-L., Bruelisauer, A., Niederberger, W., & Rowland, M. (1994). Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 22(5), 327–365.

Kerdpin, O., Knights, K. M., Elliot, D. J., & Miners, J. O. (2008). In vitro characterisation of human renal and hepatic frusemide glucuronidation and identification of the UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in this pathway. *Biochemical Pharmacology*, 76(2), 249–257.

Koh, SK., Jeong, JW., Choi, SI. (2021). Pharmacokinetics and diuretic effect of furosemide after single intravenous, oral tablet, and newly developed oral disintegrating film administration in healthy beagle dogs. *BMC Vet Res* 17, 295.

Kuepfer, L., Niederalt, C., Wendl, T., Schlender, J.-F., Willmann, S., Lippert, J., Teutonico, D. (2016). Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Build a PBPK/PD Model. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 5(10), 516–531.

Kutsuno, Y., Sumida, K., Itoh, T., Tukey, R. H., & Fujiwara, R. (2013). Glucuronidation of drugs in humanized UDP-glucuronosyltransferase 1 mice: Similarity with glucuronidation in human liver microsomes. *Pharmacology research & perspectives*, 1(1), e00002.

Lee, M. G., Li, T., & Chiou, W. L. (1986). Effect of intravenous infusion time on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the same total dose of furosemide. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 7(6), 537–547.

Loisios-Konstantinidis, I., Cristofolletti, R., Fotaki, N., Turner, D. B., & Dressman, J. (2019). Establishing virtual bioequivalence and clinically relevant specifications using in vitro biorelevant dissolution testing and physiologically-based population pharmacokinetic modeling. Case example: Naproxen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105170.

Lu, J., Goldsmith, M.-R., Grulke, C. M., Chang, D. T., Brooks, R. D., Leonard, J. A., ... Tan, Y.-M. (2016). Developing a Physiologically-Based Pharmacokinetic Model Knowledgebase in Support of Provisional Model Construction. *PLOS Computational Biology*, 12(2), e1004495.

Lu T., Fraczekiewicz G., Salphati L., Budha N., Dalziel G., Smelick GS., Morrissey KM., Davis JD., Jin JY., Ware JA. (2017) Combining "Bottom-up" and "Top-down" Approaches to Assess the Impact of Food and Gastric pH on Pictilisib. *Pharmacokinetics. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 6(11):747-755.

Matiz Melo, G. E., & Rodríguez Cavallo, E. (2015). Estudio comparativo de la calidad biofarmacéutica de marcas comerciales y multifuentes de tabletas de captopril y losartán del mercado colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 43(2), 217–233.

Magallanes L., Fagiolino P., Vazquez M., Fotaki N., Ibarra M., Lorier M., Bertola V., Barindelli A. (2016). Sex related in vitro/in vivo and PK/PD correlations after oral single dose furosemide administration. *J. Pharm Technol Drug Res.* 5:2.

Markovic, M., Zur, M., Ragatsky, I., Cvijić, S., & Dahan, A. (2020). BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide. *Pharmaceutics*, 12(12), 1175.

Martínez Pérez, J. & Bermúdez Cordoví, L. (2014). Asma bronquial y furosemida. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 39(8).

Microsoft Corporation (2018). Microsoft Excel.

Moffat, A. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material.* London, Pharmaceutical Press.

Moore J. & Flanner H. (1996). Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. *Pharmaceutical Technology*, 20, 64–74.

Muñoz E, & Díaz A, & Sutto S, & Páez F, & Ortiz M (2014). *Farmacometría.* Chávez A (Ed.), *Farmacología general. Una guía de estudio.* McGraw Hill.

National Center for Biotechnology Information (2022). Furosemide. PubChem Compound Summary for CID 3440.

Niederalt, C., Kuepfer, L., Solodenko, J., Eissing, T., Siegmund, H. U., Block, M., Willmann, S., & Li-pfert, J. (2018). A generic whole body physiologically based pharmacokinetic model for therapeutic proteins in PK-Sim. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 45(2), 235–257.

Nielsen, L. H., Rades, T., & Müllertz, A. (2015). Stabilisation of amorphous furosemide increases the oral drug bioavailability in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1-2), 334-340.

Noyes A., Whitney W. (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, 19(12), 930-934.

Oh, S. W., & Han, S. Y. (2015). Loop Diuretics in Clinical Practice. *Electrolytes & Blood Pressure*, 13(1), 17.

Oppermann, M., Hansen, P. B., Castrop, H., & Schnermann, J. (2007). Vasodilatation of afferent arterioles and paradoxical increase of renal vascular resistance by furosemide in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(1), F279–F287.

Papich M. (2021). Furosemide. *Papich Handbook of Veterinary Drugs (Fifth Edition)*. W.B. Saunders. F: 395-397

Pelkonen, O., Kapitulnik, J., Gundert-Remy, U., Boobis, A., Stockis, A. (2008). Local Kinetics and Dynamics of Xenobiotics. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(8), 697–720.

Pichette V. & du Souich P. (1996). Role of the kidneys in the metabolism of furosemide: its inhibition by probenecid. *J Am Soc Nephrol*, 7(2), 345-9.

Plumb DC. (2018) Furosemide. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 9th ed. Stockholm, WI: John Wiley & Sons.

Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, I. (2016). USP 39. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 34. Formulario nacional. United States Pharmacopeial Convention. Rockville.

Sacchetti, M., Teerakapibal, R., Kim, K., & Elder, E. J. (2017). Role of Water Sorption in Tablet Crushing Strength, Disintegration, and Dissolution. *AAPS PharmSciTech*, 18(6), 2214–2226.

Schmidt, H.A.E. (1964). Animal experiments with S35 tagged Lasix® in canine and ovine. Internal report, Radiochemical Pharmacological Laboratory, Frankfurt, West Germany, Farbwerke Hoechst.

Soares, E.C., Pereira, G.G., Petrus, L.C., Leomil Neto, M., Yamaki, F.L., Larsson, M.H.M.A. (2010) Survival and echocardiographic evaluation of dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with carvedilol. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62(3):555-563.

Takács-Novák, K., Szőke, V., Völgyi, G., Horváth, P., Ambrus, R., & Szabó-Révész, P. (2013). Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, 279-285.

Talavera, J., Fernández, M.J. (2005). Tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales. Revista oficial de AVEPA, Asociación Veterinaria Española de Especialistas en Pequeños Animales*, 25(1), 33-41.

The Merck Veterinary Manual (2015) Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ.

Thelen, K., Coboeken, K., Willmann, S., Burghaus, R., Dressman, J. B., & Lippert, J. (2011). Evolution of a detailed physiological model to simulate the gastrointestinal transit and absorption process in humans, Part 1: Oral solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(12), 5324–5345.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (2018). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. May 2018 Biopharmaceutics.

Valizadeh H, Zakeri-Milani P, Islambulchilar Z, Tajerzadeh H. (2006). A simple and rapid high-performance liquid chromatography method for determining furosemide, hydrochlorothiazide, and phenol red: applicability to intestinal permeability studies. *J AOAC Int.* 89(1):88-93.

Verbeeck R., Gerkens J., Wilkinson G., Branch R. (1981). Disposition of furosemide in functionally hepatectomized dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 216(3):479-83.

Willmann, S., Lippert, J., Sevestre, M., Solodenko, J., Fois, F., & Schmitt, W. (2003). PK-Sim®: a physiologically based pharmacokinetic “whole-body” model. *BIOSILICO*, 1(4), 121–124.

Willmann, S., Schmitt, W., Keldenich, J., & Dressman, J. B. (2003). A Physiologic Model for Simulating Gastrointestinal Flow and Drug Absorption in Rats. *Pharmaceutical Research*, 20(11), 1766–1771.

World Health Organization (WHO), Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (2006). Who Technical Report Series, fortieth report, Geneva, Annex 7, pp. 358-413.

Yakatan GJ, Maness DD, Scholler J, Johnston JT, Novick WJ Jr, Doluisio JT. (1979). Plasma and tissue levels of furosemide in dogs and monkeys following single and multiple oral doses. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 24(3):465-82.

Zandvliet, M., & Teske, E. (2015). Mechanisms of Drug Resistance in Veterinary Oncology— A Review with an Emphasis on Canine Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 2(3), 150–184.

Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, Xie S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* 12:263–271.

Zhang, X., Lionberger, R.A., Davit, B.M., Yu, L.X. (2011). Utility of physiologically based absorption modeling in implementing quality by design in drug development. *AAPS J.* 13 (1), 59–71.



Anexo I. Técnicas de laboratorio para la determinación de la estabilidad de furosemide en metanol y medios de disolución biorrelevantes

a. Determinación de la estabilidad de las soluciones metanólicas de furosemide en heladera (4-8 °C)

Objetivo: evaluar la estabilidad de las soluciones metanólicas de furosemide en heladera a una temperatura controlada entre 4°C y 8°C, a ser utilizadas en los ensayos analíticos de cuantificación de furosemide requeridos para la investigación correspondiente a la Tesis de Maestría en Química del estudiante Q.F. Cristian Valiante titulada “Estudio de disolución biorrelevante *in vitro* y modelado farmacocinético *in silico* de formulaciones de Furosemide para terapia cardiovascular de administración oral en perros”.

Alcance: este procedimiento se aplica al Área Analítica del laboratorio y a todos los ensayos de furosemide en medios de disolución y en plasma canino realizados en CEBIOBE (Centro de Evaluación de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Medicamentos) y LAFAVET (Laboratorio de Farmacología Veterinaria)

Procedimiento y descripción de actividades: a partir del estándar sólido de furosemide (potencia 99.67%) se preparó la solución madre A de furosemide por pesada directa de $m=49.8\text{mg}$ y disolución en metanol (MeOH) calidad HPLC hasta un volumen de 10mL en material aforado. A partir de la solución madre A se preparó una solución problema B1 el 15/11 y una solución de referencia B2 el 14/12 en metanol ambas de concentración teórica 49.64 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones fueron preparadas el día indicado permaneciendo períodos en mesada de 8 horas aproximadamente desde su generación hasta su almacenamiento en heladera. Bajo estas condiciones se conservaron hasta el día de su análisis. La temperatura de la heladera fue monitoreada con termógrafo.

A todas las soluciones se les realizó una dilución 3/10 en fase móvil para inyección en HPLC el día del análisis (14/12) por duplicado y posteriormente se inyectaron 20 μL de cada solución en HPLC. La separación de furosemide fue realizada por HPLC de fase reversa en las siguientes condiciones:



- **Columna Phenomenex Kinetex® C18 (100Å, 2.6 um, 4.6x150mm)**
- **Temperatura de horno de columna = 37°C**
- **Fase móvil acetonitrilo:buffer fosfato pH 3.0 en proporción relativa 35:65 v/v**
- **Flujo = 0.650 mL/min**
- **Tiempo total de corrida = 10 minutos.**

Resultados: los resultados obtenidos de área (en mAU*min) de las soluciones B1 y B2 se presentan en la siguiente tabla:

Muestra	Área (mAU*min)	Promedio de áreas (mAU*min)	SD (%)
B2 14/12 i	34.62	35.01	-1.97
B2 14/12 ii	35.40		
B1 15/11 i	34.30	34.32	
B1 15/11 ii	34.34		

Tabla 1. Resultados de áreas de soluciones metanólicas de furosemide preparadas para la determinación de la estabilidad con conservación en heladera (4-8 °C).

La desviación estándar (SD) relativa en forma de porcentaje fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$SD (\%) = 100 * \frac{(E - T)}{T}$$

Siendo E el promedio de áreas para la solución del día 15/11 y T el promedio de áreas para la solución del día 14/12. Los resultados demuestran que las condiciones de almacenamiento utilizadas (entre 4 y 8 °C en heladera) aseguran estabilidad para soluciones metanólicas de furosemide (desviación respecto al valor teórico menor al 5%) por un período de 30 días, para una concentración aproximada de 50 µg/mL.



Observaciones: no aplicable.

Responsabilidad: la responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del laboratorio anteriormente citado. Sin perjuicio de lo anterior los supervisores del área analítica son responsables de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

Conclusiones: considerando los resultados del informe de análisis, se puede concluir que las condiciones de almacenamiento utilizadas aseguran estabilidad para soluciones metanólicas de furosemide (desviación respecto al valor teórico menor al 5%) por un período de 30 días, para un rango de concentraciones entre 50 y 1000 $\mu\text{g/mL}$.

b. Control de la estabilidad de las soluciones calibradoras de furosemide en los medios biorrelevantes para los ensayos de disolución en aparato USP II

Objetivo: evaluar la estabilidad de las soluciones calibradoras de furosemide preparadas en los medios biorrelevantes a ser utilizadas en los ensayos de disolución para la investigación correspondiente a la Tesis de Maestría en Química del estudiante Q.F. Cristian Valiente titulada “Estudio de disolución biorrelevante *in vitro* y modelado farmacocinético *in silico* de formulaciones de Furosemide para terapia cardiovascular de administración oral en perros”.

Alcance: este procedimiento se aplica al Área Analítica del laboratorio y a todos los ensayos de disolución de comprimidos de furosemide realizados en CEBIOBE (Centro de Evaluación de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Medicamentos) y/o LAFAVET (Laboratorio de Farmacología Veterinaria), Universidad de la República.

Procedimiento y descripción de actividades: se preparó una curva de calibración por medio de disolución a cada uno de los tres pH de trabajo (1.2, 4.5 y 6.8) con seis soluciones calibradoras (E1 a E6) de acuerdo a las concentraciones presentadas en la siguiente tabla:



Concentración teórica (mg/mL)	Solución calibradora
0.0550	E1
0.0440	E2
0.0330	E3
0.0220	E4
0.0110	E5
0.0022	E6

Tabla 2. Soluciones calibradoras (E1 a E6) con sus correspondientes concentraciones teóricas aproximadas en mg/mL.

La solución estándar de mayor concentración (E1) fue preparada de acuerdo al siguiente procedimiento: se pesa en balanza analítica 27.50 mg de furosemide estándar sólido guardado en forma protegida de la luz y con humedad controlada, se coloca en matraz aforado de 50.0 mL, se disuelve con la mínima cantidad posible de metanol y se lleva a volumen con el medio de disolución correspondiente. De esta solución se toman 5.0 mL y se diluye en matraz aforado de 50.0 mL con el medio de disolución correspondiente, obteniendo una concentración de 0.055 mg/mL de furosemide. Esta solución para cada uno de los tres medios de disolución a utilizar corresponde al 125 % de la cantidad declarada de principio activo contenida en un comprimido disuelto en 900 mL de medio de disolución. Las otras cinco soluciones de calibración se preparan a partir de E1 por dilución de acuerdo a los cálculos realizados y utilizando en todos los casos material de vidrio aforado.

Previo a las determinaciones de furosemide por espectrofotometría UV en los ensayos de disolución utilizando las curvas de calibración realizadas, se controlan las soluciones calibradoras E1, E3 y E6 a modo de evaluar su estabilidad en cada uno de los pH de trabajo durante el tiempo en días en el cual se estuvieron realizando estos ensayos.

Se calcula la desviación estándar (SD) relativa porcentual con la concentración experimental de la solución calibradora en la fecha correspondiente comparada con la



misma en la fecha de elaboración a partir del estándar de furosemide. Se procede con el mismo cálculo de SD presentado en la determinación de la estabilidad de las soluciones metanólicas de furosemide y se tolera como máximo un valor del 2% entre las concentraciones experimentales en mg/mL de las soluciones calibradoras E1, E3, E6 preparadas en la fecha de comienzo del análisis a cada pH de trabajo y preparadas en la fecha de finalización del mismo.

La ecuación matemática utilizada para el cálculo de la desviación estándar relativa en porcentaje fue la siguiente:

$$SD (\%) = 100 * \frac{(Cf - Ci)}{Ci}$$

Siendo Cf la concentración en mg/mL determinada experimentalmente para la solución control a la fecha de finalización de los ensayos correspondientes a cada uno de los pH de trabajo y Ci la concentración en mg/mL determinada experimentalmente para la solución control a la fecha de inicio de los mismos. Las concentraciones se determinan utilizando el método validado por espectrofotometría UV a través de la misma curva de calibración, destacando el uso de una única curva de calibración por pH de medio de disolución.

Resultados: los resultados correspondientes al control de la estabilidad de las soluciones calibradoras de furosemide E1, E3 y E6 en los medios biorrelevantes para los ensayos de disolución en aparato USP II a pH 1.2, 4.5 y 6.8 se presentan en la siguiente tabla:

pH	Fecha	Solución	Concentración (mg/mL)	SD (%)
1.2	17/8	E1	0.05593	-
		E3	0.03240	-
		E6	0.00227	-



4.5	24/8	E1	0.05590	-0.064
		E3	0.03227	-0.429
		E6	0.00223	-1.589
	24/8	E1	0.05499	-
		E3	0.03276	-
		E6	0.00222	-
	27/8	E1	0.05460	-0,7029
		E3	0.03235	-1,2431
		E6	0.00218	-1,841
6.8	30/8	E1	0.05546	-
		E3	0.03294	-
		E6	0.00227	-
	1/9	E1	0.05559	0,22989
		E3	0.03270	-0.74137
		E6	0.00225	-1.12310

Tabla 3. Resultados correspondientes al control de la estabilidad de las soluciones calibradoras de furosemide E1, E3 y E6 en los medios biorrelevantes para los ensayos de disolución en aparato USP II a pH 1.2, 4.5 y 6.8 expresados como concentración experimental (en mg/mL) en fecha de inicio y de finalización de los ensayos correspondientes a cada pH de trabajo y desviación estándar relativa en porcentaje.



Anexo II. Técnica experimental y validación del método analítico para la extracción y cuantificación de furosemide en plasma canino.

Objetivos:

- Explicitar el procedimiento y la descripción de actividades experimentales correspondientes a la técnica de cuantificación de furosemide en plasma canino por sistema HPLC-FLD.
- Presentar la metodología experimental y los resultados de la validación del método analítico anteriormente citado.

Alcance: este procedimiento se aplica al Área Analítica del laboratorio y a todos los ensayos de cuantificación de furosemide en plasma canino realizados en LAFAVET (Laboratorio de Farmacología Veterinaria), Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Procedimiento y descripción de actividades: en el método analítico validado la extracción de furosemide del plasma canino separado previamente de la sangre por centrifugación (a 10000g por 5 minutos a 4°C) se realiza a través de una precipitación de proteínas plasmáticas con metanol a temperatura ambiente en medio ácido por agregado a ácido perclórico al 5% v/v.

A 500uL de plasma conteniendo el analito furosemide (FURO) en tubo Eppendorf® de 1.5mL se le agregan 20uL de la solución de trabajo del estándar interno imipramina (IMP) con jeringa de vidrio, 230uL de metanol (MeOH) y 450uL de ácido perclórico en solución acuosa al 5% v/v conservado en frasco ámbar a temperatura ambiente. Se agita por vórtex durante 30 segundos y se procede a centrifugar a 10000g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Se separa el sobrenadante a vial de vidrio color ámbar y se inyecta en el sistema HPLC.

El método analítico para la cuantificación de furosemide fue desarrollado por el sistema UHPLC-FLD Dionex Ultimate 3000 Series con detector de arreglo de diodos Dionex DAD-3000 y controlado por el software Chromeleon de Dionex. El proceso de separación se realizó por fase reversa utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (15 cm x 4.6



mm, 5 μ m) a 37°C y una fase móvil acetonitrilo:buffer fosfato pH 3.0 en proporción relativa 35:65 v/v a flujo 0.650mL/min durante un tiempo total de corrida de 12 minutos. El volumen de inyección fue 50 μ L y la detección se realizó a través de detector de fluorescencia con longitudes de onda de emisión a 270nm y excitación a 470nm, cuantificando a través de la relación de áreas entre los picos de estándar interno y analito en forma de cociente.

Para la determinación del rango y la linealidad del método, se utilizaron cinco soluciones patrón (calibradores) preparadas a partir de una solución metanólica estándar del analito a una concentración de aproximadamente 3000 μ mol/L (992,2 mg/L) por fortificación directa del plasma canino utilizando pipeta automática y material de vidrio aforado para realizar las diluciones apropiadas. Dichas soluciones patrón corresponden a las concentraciones aproximadas de: 30 μ mol/L, 15 μ mol/L, 3 μ mol/L, 0.3 μ mol/L y 0.03 μ mol/L. Las soluciones estándar de furosemide e imipramina se prepararon por pesada directa en balanza analítica de los reactivos en estado sólido conservados a temperatura ambiente en humedad controlada y disolución en metanol calidad HPLC utilizando material de vidrio aforado. Todas las soluciones metanólicas y plasmáticas se almacenan protegidas de la luz en freezer a -4°C.

Resultados: se presentan a continuación las soluciones de calibración utilizadas con sus concentraciones reales (por triplicado) en μ mol/L, μ g/L, el área relativa promedio, su correspondiente coeficiente de variación (C.V.) en porcentaje y como figura la curva de calibración determinada.

Solución estándar	Conc. (μ mol/L)	Conc. (μ g/L)	Área relativa FURO/IMP	C.V. (%)
S1	30.300	10021.57	29.778	3.67
S2	15.150	5010.79	14.781	2.94
S3	3.030	1002.16	2.676	1.01



S4	0.303	100.22	0.265	0.54
S5	0.030	10.02	0.027	1.58
S6	0.015	4.96	0.015	6.97

Tabla 1. Soluciones estándar utilizadas en la determinación del rango y la linealidad para furosemide con sus concentraciones expresadas en $\mu\text{mol/L}$, $\mu\text{g/L}$, el área relativa promedio FURO/IMP (analito furosemide/estándar interno imipramina) y su correspondiente coeficiente de variación (C.V.) en porcentaje.

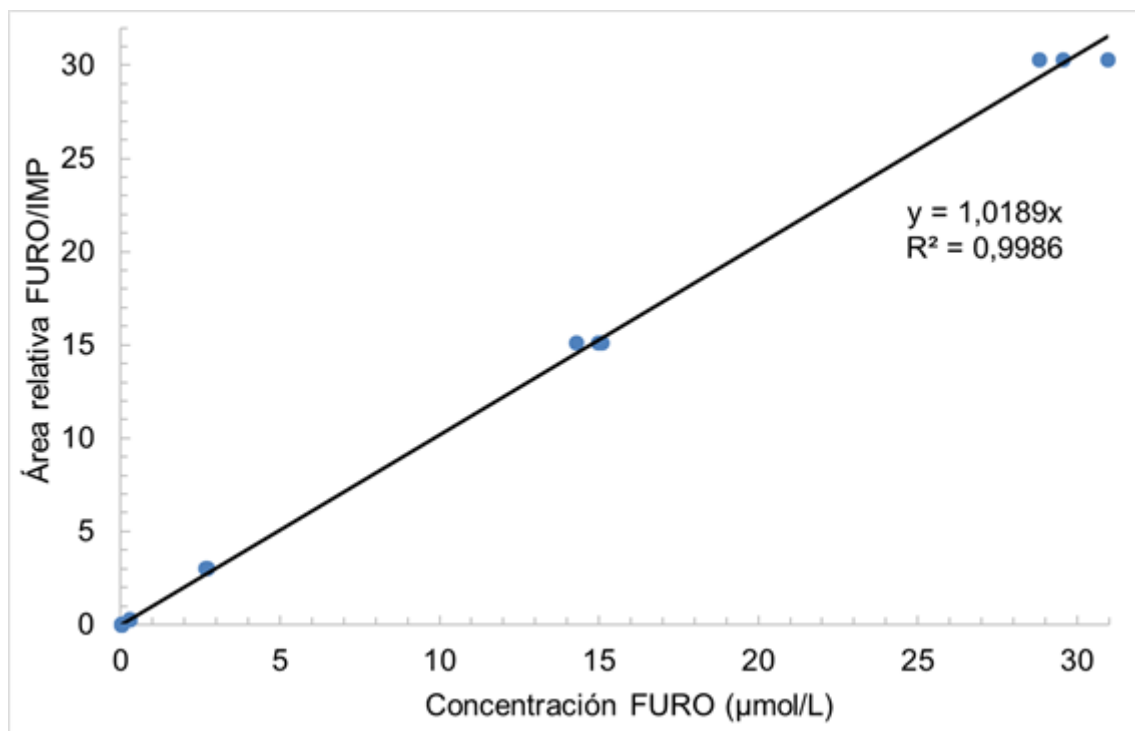


Figura 1. Curva de calibración de furosemide expresada como la concentración de analito (FURO) en $\mu\text{mol/L}$ en función del área relativa analito/estándar interno (FURO/IMP). Los puntos en color azul representan las observaciones experimentales y la recta continua en color negro corresponde a la línea de tendencia. Se expresa en el gráfico la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación con 4 cifras significativas decimales.



Se presentan a continuación los resultados de los ensayos de precisión y exactitud en función de las concentraciones reales y teóricas promedio para las soluciones de referencia a los tres niveles de concentración del rango de linealidad expresando la precisión como coeficiente de variación (CV) calculado a partir de la desviación estándar (SD) y la exactitud como porcentaje de apartamiento calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Apartamiento (\%)} = \frac{|C_{\text{real}} - C_{\text{teórica}}|}{C_{\text{real}}} \cdot 100$$

Para la evaluación de la exactitud la preparación de los controles se realizó por triplicado con pesadas independientes a partir del estándar de furosemide sólido disolviendo en la mínima cantidad necesaria de metanol, fortificándose luego el plasma canino blanco hasta obtener la concentración de referencia real (C_{real}). Se determinó la concentración teórica de furosemide ($C_{\text{teórica}}$) procesando los controles de referencia con el método analítico de extracción y posterior cuantificación por HPLC-FLD, evaluando las áreas relativas FURO/IMP con la curva de calibración obtenida anteriormente. Se expresan dichos resultados en la siguiente tabla:

Solución estándar	C_{real} ($\mu\text{mol/L}$)	Área relativa promedio	CV (%)	C_{teórica} ($\mu\text{mol/L}$)	Apartamiento (%)
Ref1	7.331	6.549	2.86	6.669	9.03
Ref2	14.863	13.708	1.32	13.959	6.08
Ref3	22.673	22.420	0.79	22.831	0.70

Tabla 2. Resultados finales de los ensayos de precisión y exactitud.



Para el ensayo de recuperación se utilizaron las soluciones estándar de referencia anteriormente citadas en los niveles de concentración (nivel bajo, medio y alto) versus extractos de blancos enriquecidos con el analito posterior a la extracción a los mismos niveles de concentración. Los resultados de recuperación expresados en % de analito (furosemide) son presentados en la siguiente tabla:

Concentración ($\mu\text{mol/L}$)	Muestra	Área promedio (UA)	Recuperación (%)
22.67	Ref1	4800290	86.42
	Rec1	4148225	
15.12	Ref2	3126390	85.20
	Rec2	2669594	
7.58	Ref3	1573528	80.96
	Rec3	1273871	

Tabla 3. Resultados del ensayo de recuperación para furosemide a tres concentraciones de referencia. Las muestras de referencia se abreviaron Ref mientras que las muestras procesadas a partir de plasma blanco fortificado con analito se abreviaron Rec. Se expresa el porcentaje de recuperación para cada concentración de referencia.

Observaciones: no aplicable.

Responsabilidad: la responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del laboratorio anteriormente citado. Sin perjuicio de lo anterior los supervisores del área analítica son responsables de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

Anexo III. Preparación de medios de disolución biorrelevantes para los ensayos de disolución de comprimidos de furosemide de liberación inmediata.

Objetivo: el objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la preparación de medios de disolución biorrelevantes a ser utilizadas en los ensayos de disolución para la investigación correspondiente a la Tesis de Maestría en Química del estudiante Q.F. Cristian Valiente titulada “Estudio de disolución biorrelevante *in vitro* y modelado farmacocinético *in silico* de formulaciones de Furosemide para terapia cardiovascular de administración oral en perros”.

Alcance: este procedimiento se aplica al Área Analítica del laboratorio y a todos los ensayos de disolución de comprimidos de furosemide realizados en CEBIOBE (Centro de Evaluación de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Medicamentos), Facultad de Química, Universidad de la República.

Responsabilidad: la responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE. 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.

Procedimiento y descripción de actividades:

- **Medio 1: Solución de KCl/HCl pH 1.2**

Se pesa en balanza 3.73 g de cloruro de potasio calidad ppa y se disuelve en aproximadamente 950 mL de agua destilada para posteriormente agregar aproximadamente 7 mL de ácido clorhídrico concentrado, diluir a 1000 mL con agua destilada, verificar pH: 1.2 ± 0.1 y ajustar si es necesario con ácido clorhídrico concentrado.

- **Medio 2: buffer acetato pH 4.5**

Esta solución buffer se preparó disolviendo 6.8 g de fosfato monobásico de potasio calidad ppa en aproximadamente 950 mL de agua destilada, llevando a volumen final (1000mL) y ajustando pH con una solución de ácido fosfórico 0.1 mol/L a un valor de 4.5 ± 0.1 previo a la realización del ensayo.

- **Medio 3: buffer fosfato pH 6.8**

Esta solución buffer se preparó disolviendo 6.8 g de fosfato monobásico de potasio calidad ppa en aproximadamente 950 mL de agua destilada, llevando a volumen final (1000mL) y ajustando pH con una solución de hidróxido de sodio 1.0 mol/L a un valor de 6.8 ± 0.1 al momento de su preparación y con verificación previa a la realización del ensayo.

Observaciones: no aplicable.

Responsabilidad: la responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del laboratorio anteriormente citado. Sin perjuicio de lo anterior los supervisores del área analítica son responsables de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.



Anexo IV. Protocolo experimental del ensayo de bioequivalencia y perfiles farmacocinéticos individuales

El ensayo de bioequivalencia en perros sanos fue realizado de acuerdo al protocolo experimental aprobado por la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal) comprendido en formulario número 1174 en la fecha de aprobación 26/09/2020 con actualización informada a la CEUA (Comisión de Ética en el Uso de Animales) en la fecha 28/04/2022.

Datos generales del protocolo y responsabilidad asociada

Título del protocolo (año 2020)	Modelado farmacocinético <i>in silico</i> de formulaciones para terapia cardiovascular de administración oral en perros.
Servicio que evalúa el protocolo	Facultad de Veterinaria, UdelaR
Responsable	PhD. Dr. Gonzalo Suárez
Institución	Facultad de Veterinaria, UdelaR
Cátedra	Unidad de Farmacología y Terapéutica
Departamento	Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario
Laboratorio	LAFAVET (Laboratorio de Farmacología Veterinaria)
Nivel de acreditación CHEA	C2
Vencimiento del protocolo	Año 2023
Duración	Período 2021-2022
Actividad	Extracción de muestras sanguíneas en perros sanos de acuerdo al ensayo de bioequivalencia de formulaciones orales de furosemide de uso veterinario.
Origen de los fondos	Porventos de la Unidad de Farmacología y Terapéutica y alícuota correspondiente a PEDECIBA Química.



Datos generales del proyecto elevados a la CHEA

Título del proyecto	Estudio de disolución biorrelevante <i>in vitro</i> y modelado farmacocinético <i>in silico</i> de formulaciones de furosemide para terapia cardiovascular de administración oral en perros.
Objetivo	Investigación
Insumos	Ensayo de bioequivalencia y análisis de laboratorio
Razón de la especie seleccionada	Se pretende abordar el estudio farmacocinético de formulaciones orales de furosemide de uso veterinario. El modelo <i>in silico</i> será realizado en perros por lo tanto la contrastación <i>in vivo-in silico</i> debe realizarse a través de un ensayo experimental en la misma especie para la óptima correlación de resultados.
Relevancia	Los resultados de perfiles farmacocinéticos obtenidos por modelado PBPK <i>in silico</i> pueden predecir diferencias significativas en la intercambiabilidad entre formulaciones de los fármacos estudiados o bien respaldar la necesidad de realizar estudios farmacocinéticos <i>in vivo</i> para estos productos.
Total de animales	Aprobación para 9 perros, utilización de 6 perros.
Fármacos del proyecto	Furosemide

Actualización CEUA y especificaciones del ensayo experimental

De acuerdo al protocolo de experimentación ya existente (número de formulario es 1174) bajo la responsabilidad de Dr. Gonzalo Suárez (nivel de acreditación CHEA C2), en marco de la tesis de maestría del estudiante Q.F. Cristian Valiante desarrollada en el laboratorio de Farmacología Veterinaria (LAFAVET) de Facultad de Veterinaria (UdelaR), se solicitaron las siguientes modificaciones y realizaron las aclaraciones pertinentes:

- 1) A los animales de experimentación se les administró una dosis única oral de dos comprimidos de furosemide y se realizó el muestreo de sangre desde el tiempo



inicial hasta las 6 horas (máximo) a modo de generar la curva farmacocinética correspondiente con un total de 5 tiempos de muestreo establecidos aproximadamente a: 30min, 70min, 110min, 150min, 300min.

- 2) Únicamente se realizó la administración de un fármaco (furosemide) y la misma fue por vía oral y en dosis única para cada formulación, administrándose los productos veterinarios 1 (PV1) y 2 (PV2)
- 3) El ensayo clínico es cruzado y compensado. Cada animal recibe en dos períodos separados (luego del tiempo de lavado correspondiente a una semana) una dosis única de ambas formulaciones veterinarias. El ensayo puede repetirse luego de un período acorde para aumentar la potencia estadística y estudiar la variabilidad interocasión, en dicho caso cada animal recibe en dos oportunidades cada formulación de furosemide.
- 4) Las muestras de sangre a extraer corresponden cada una a 3mL de sangre en tubo heparinizado de 4mL. En total se extraen 5 muestras por curva farmacocinética. La extracción se realizó utilizando catéter 18G.
- 5) Los objetivos generales, específicos y el marco experimental del protocolo corresponden a la tesis de maestría citada en el título del proyecto.

Datos de los perros que participaron del ensayo de bioequivalencia

- ID=1: nombre Cira, sexo hembra, nacimiento 08/04/2019, raza Pastor belga Malinois y peso corporal de 26 Kg.
- ID=2: nombre Dagon, sexo macho, nacimiento 13/06/2020, raza Ovejero alemán y peso corporal de 30 Kg.
- ID=3: nombre Bonka, sexo hembra, nacimiento 14/06/2019, raza Pastor belga malinois y peso corporal de 25 Kg.
- ID=4: nombre Corin, sexo hembra, nacimiento 08/04/2019, raza Pastor belga malinois y peso corporal de 24 Kg.

- ID=5: nombre Boll, sexo macho, nacimiento 14/06/2018, raza Pastor belga malinois y peso corporal de 27 Kg.
- ID=6: nombre Dark, sexo macho, nacimiento 13/06/2020, raza Ovejero alemán y peso corporal de 30 Kg.

Resultados individuales

Se presentan a continuación las curvas plasmáticas para cada uno de los seis individuos (ID) del ensayo para ambos tratamientos (test y referencia):

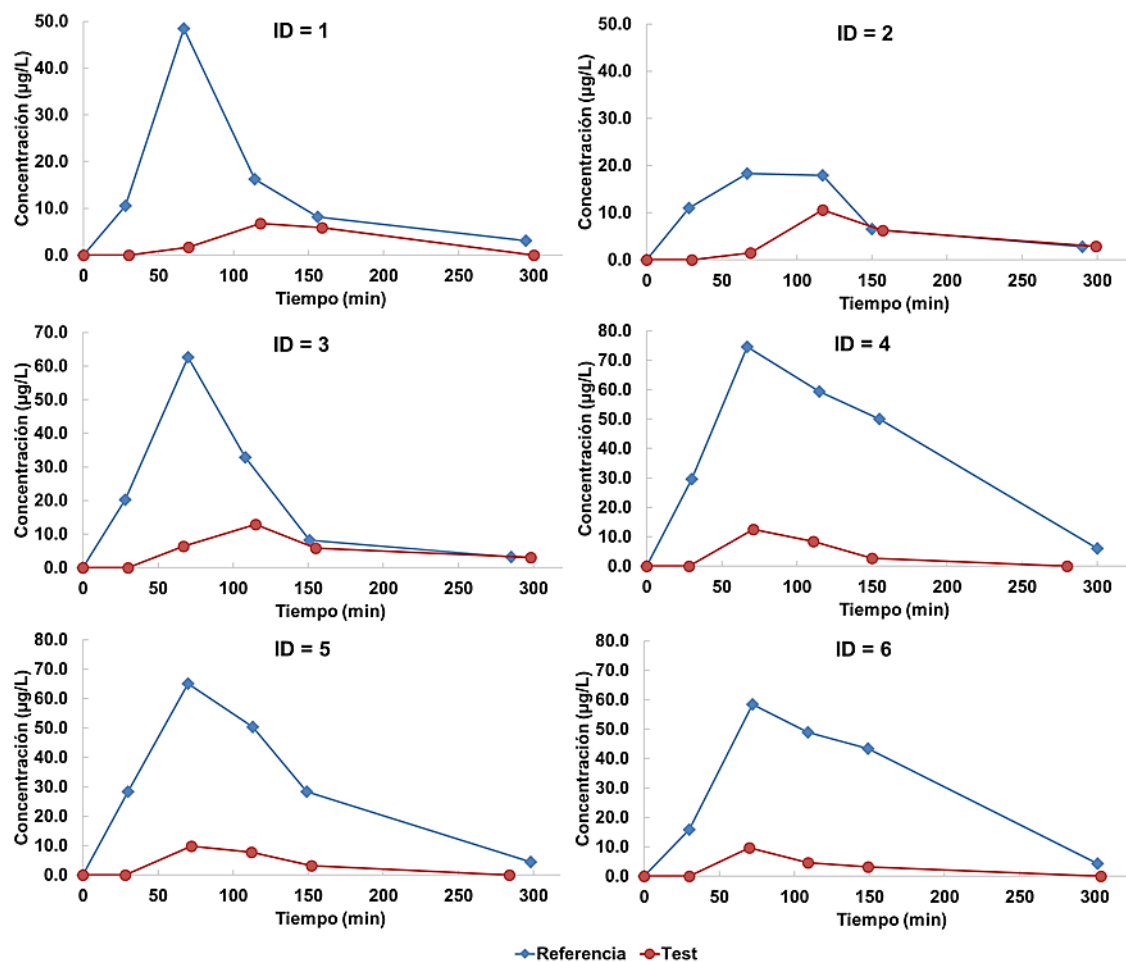


Figura 1. Perfiles farmacocinéticos de concentración (en µg/L) en función del tiempo (en minutos) para ambos tratamientos (referencia en color azul y test en color rojo) para los individuos (ID) que participaron del ensayo (n=1 a n=6).

Se realizó un gráfico “de espagueti” mostrando las curvas farmacocinéticas individuales de cada uno de los seis perros del ensayo por separado para la formulación test y para la

formulación referencia, aplicando una coloración de las curvas que permite diferenciar en dos grupos según sexo: machos y hembras. Dichos gráficos se muestran a continuación:

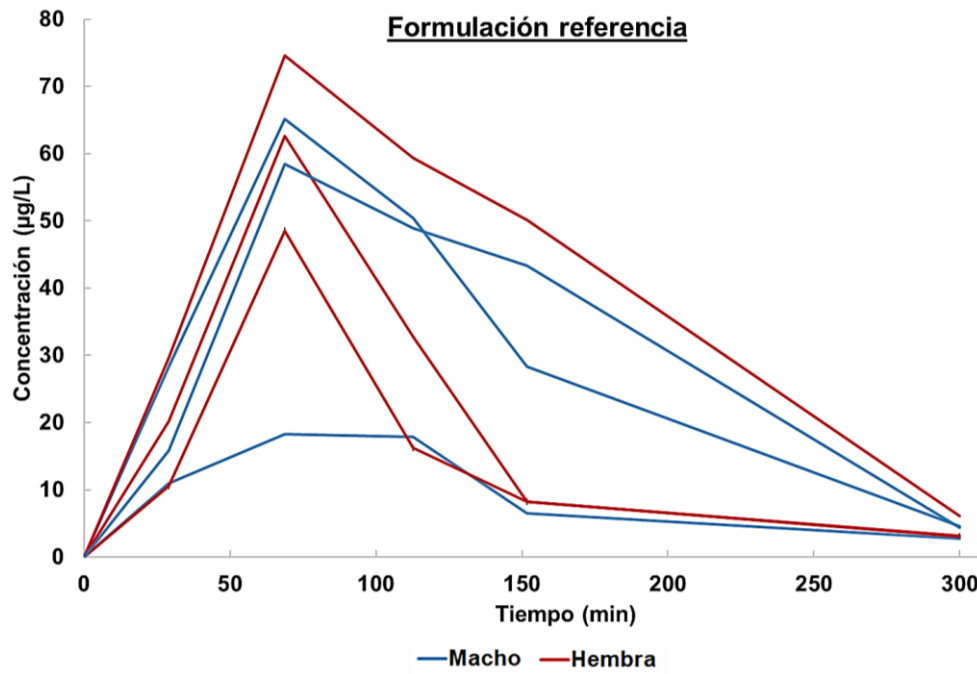


Figura 2. Gráfico de espagueti para la formulación de referencia. Se colorean en azul los perfiles farmacocinéticos correspondientes a perros machos y en rojo los perfiles correspondientes a hembras.

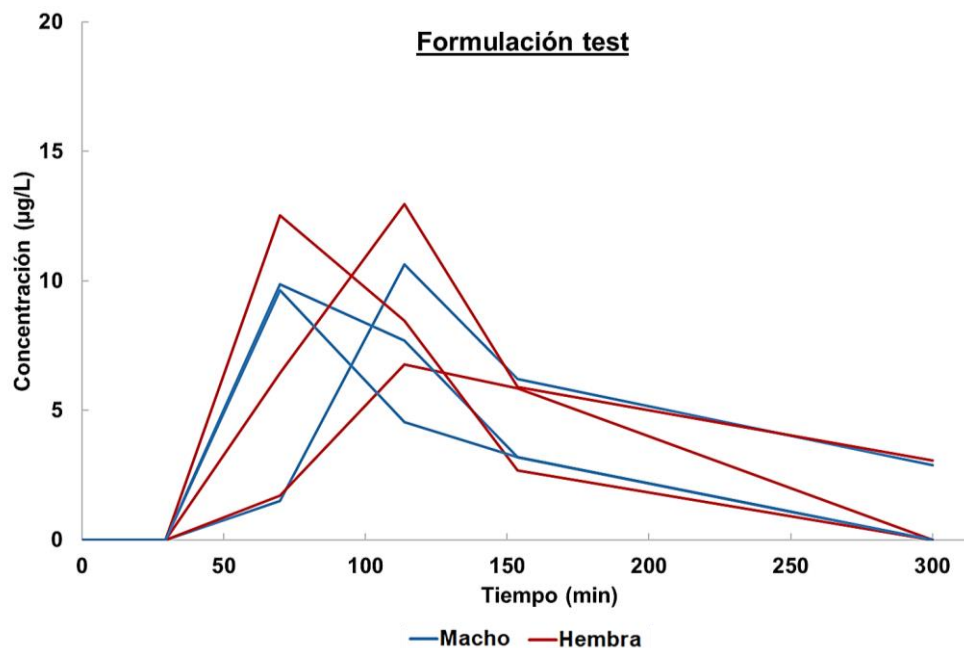




Figura 3. Gráfico de espagueti para la formulación test. Se colorean en azul los perfiles farmacocinéticos correspondientes a perros machos y en rojo los perfiles correspondientes a hembras.

Participación del ensayo

Participaron en calidad de observadores sin responsabilidad asociada (de acuerdo al protocolo) el estudiante de maestría Q.F. Cristian Valiante y la tutora PhD. Q.F. Silvana Alvariza. Ambos participantes se encuentran acreditados en la categoría B de la CHEA (técnico experimentador y/o ayudante de clases prácticas y/o estudiante de posgrado).

Gonzalo Suárez, PhD
Jefe de la Unidad de Farmacología.
Facultad de Veterinaria, UdelaR.